

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Biomedicína

Studijní program: Experimentální chirurgie



UNIVERZITA KARLOVA  
1. lékařská fakulta

**MUDr. Jan Kučera**

*Mezibuněčné interakce v kožních nádorech*

*Intercellular interactions in skin tumors*

Typ závěrečné práce: Disertační

Školitel: prof. MUDr. Karel Smetana, Jr., DrSc.

Školitel konzultant: prof. MUDr. Jiří Štork, CSc.

Praha, 2019

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 1. 11. 2019

Podpis.....

MUDr. Jan Kučera

### **Identifikační záznam:**

KUČERA, Jan. *Mezibuněčné interakce v kožních nádorech. [Intercellular interactions in skin tumors]*. Praha, 2019. Počet stran 56, počet příloh 5. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Anatomický ústav 1. LF UK, Dermatovenerologická klinika 1. LF UK a VFN. Vedoucí práce Smetana, Karel.

## **Abstrakt**

Tato disertační práce je zaměřená na studium mezibuněčných interakcí u kožních nádorů. Je založena na 5 původních publikacích, které se věnují několika tematickým okruhům.

Věnovali jsme se studiu původu nádorově asociovaných fibroblastů ve vztahu k primární nádorové populaci. Prokázali jsme pomocí myšího modelu, že nádorově asociované fibroblasty vzniklé v okolí implantovaného tumoru byly původem hostitelského organismu, a tedy že nevznikly transformací přímo z nádorových buněk.

Dále jsme experimentálně sledovali vztah mezi nádorově asociovanými fibroblasty a keratinocyty. Prokázali jsme, že nádorově asociované fibroblasty z melanomu ovlivňují keratinocyty, které pod jejich vlivem získávají znaky typicky pozorované u migrujících buněk a u buněk podléhajících epitelově mezenchymálnímu přechodu.

Studovali jsme interakce mezi zdravými fibroblasty a nádorovými buňkami. Prokázali jsme, že fibroblasty odebrané ze zdravé kůže u pacienta postiženého melanomem se významně odlišují od kontrolních fibroblastů zdravých dárců v expresním profilu. Změny v distálních fibroblastech podporují pohled na melanom jako na systémové onemocnění. Dále jsme prokázali, že na rozdíl od BRAF pozitivních melanomových buněk, melanom asociované fibroblasty nenesou BRAF mutaci, a tedy nevznikly přechodem z melanomu. Systémový efekt maligního melanomu jsme dále studovali v experimentu zaměřeném na serologický profil postižených pacientů. U pacientů s melanomem jsme prokázali řadu významných serologických odlišností oproti zdravým kontrolám. Tyto výsledky tedy dále potvrdily vliv melanomu na řadu orgánových systémů.

V posledním okruhu jsme se věnovali možností ovlivnění vzniku nádorově asociovaných fibroblastů. Konkrétně jsme studovali možnost inhibice transformace fibroblastů v nádorově asociované fibroblasty (CAF) pomocí syntetických polyaminů, tedy molekul ovlivňujících aktinový cytoskelet. Sledovali jsme, zda je možné blokovat transformační efekt TGF-beta1 (Transformující růstový faktor beta1) na fibroblasty pomocí polyaminu BPA-C8. Prokázali jsme inhibiční vlastnosti BPA-C8 na vznik CAF a dále také vliv tohoto polyaminu na extracelulární matrix a životaschopnost fibroblastů.

Celkově jsme tedy na několika úrovních prokázali význam mezibuněčných interakcí na biologické chování kožních nádorů a nádorového mikroprostředí. Porozumění mechanismům mezibuněčných interakcí může přinést zlepšení diagnostiky a terapie nádorových onemocnění.

**Klíčová slova:** kožní nádory, nádorové mikroprostředí, nádorově asociované fibroblasty, melanom, cytokiny, polyaminy

## **Abstract**

The dissertation is focused on the study of intercellular interactions in skin tumors. It is based on 5 original publications that cover several topics.

We studied the origin of tumor-associated fibroblasts concerning the primary tumor population. We demonstrated using a mouse model that tumor-associated fibroblasts are produced from the host organism and thus did not arise from transformation directly from tumor cells.

We also investigated the relationship between tumor-associated fibroblasts and keratinocytes. We have shown that tumor-associated melanoma fibroblasts affect keratinocytes which, under their influence, acquire the features typically observed in migrating cells and cells undergoing epithelial-mesenchymal transition.

We studied the interactions between healthy fibroblasts and tumor cells. We have demonstrated that fibroblasts acquired from healthy skin from a patient suffering from melanoma are significantly different from control fibroblasts of healthy donors in the expression profile. Changes in distal fibroblasts support the view of melanoma as a systemic disease. We have further demonstrated that melanoma-associated fibroblasts do not carry a BRAF mutation, in contrast to BRAF positivity of melanoma cells. And therefore, they did not arise from the transition from melanoma. The systemic effect of malignant melanoma was further studied in an experiment focused on the serological profile of affected patients. In patients with melanoma, we have shown various significant serological differences from healthy controls. Thus, these results further confirmed the effect of melanoma on several organ systems.

In the last topic, we focused on the possibilities of influencing the formation of tumor-associated fibroblasts. In particular, we studied the possibility of inhibiting the transformation of fibroblasts into CAF by polyamines, ie synthetic molecules affecting the actin cytoskeleton.

We investigated whether it is possible to block the transforming effect of TGF-beta 1 on fibroblasts by using polyamine BPA-C8. We demonstrated the inhibitory properties of BPA-C8 on CAF formation and the effect of this polyamine on extracellular matrix and fibroblast viability.

Overall, we have demonstrated the importance of intercellular interactions on the biological behavior of skin tumors and the tumor microenvironment at several levels. Understanding the mechanisms of intercellular interactions can result in more refined diagnostics and more effective cancer therapy.

**Key words:** skin tumors, tumor microenvironment, **cancer**-associated fibroblasts, melanoma, cytokines, polyamines

## **Poděkování**

Tato dizertační práce vznikla díky vřelé podpoře a vynikajícímu vedení mých školitelů prof. MUDr. Karla Smetany, Jr., DrSc. a prof. MUDr. Jiřího Štorka, CSc.. Za jejich podnětné připomínky a neocenitelnou podporu jsem jim srdečně vděčný.

Výrazné díky dále patří mým blízkým spolupracovníkům z Anatomického ústavu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy: RNDr. Barboře Dvořánkové, PhD., MUDr. Lukáši Lacinovi, PhD., RNDr. Pavolovi Szabovi, Ph.D., MUDr. Ondřejovi Kodetovi, PhD., MUDr. Alžbětě Jechové, PhD, Mgr. Karolíně Strnadové a Mgr. Rosaně Mateu.

Ze zahraničních spolupracovníků bych rád poděkoval především panu prof. Jean-Marie Lehnovi, prof. Hans-Joachim Gabiusovi, Dr. Sabine André a Dr. Girish Koripellymu.

V neposlední řadě děkuji prim. MUDr. I. Krajsové, MBA. z Dermatovenerologické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze a dále nepostradatelným externím spolupracovníkům prof. RNDr. Blance Říhové, DrSc., prof. MUDr. P. Dundrovi, Ph.D., Ing. Hynku Strnadovi, Ph.D., Mgr. Michalu Kolářovi, Ph.D., RNDr. Čestmíru Vlčkovi, PhD., doc. RNDr. Běle Bendlové, CSc., a RNDr. Vlastě Sýkorové, PhD.

Mé díky patří také všem pacientům a dárcům biologických materiálů, jejichž ochota podílet se dobrovolně a nezištně na výzkumné práci byla nenahraditelná.

Závěrem bych rád poděkoval za asistenci laboratorním pracovníkům Marii Jindrákové, Radaně Kavkové a Marii Šlajsové.

## **Seznam zkratek:**

ACF – Autologní kontrolní fibroblasty

BMP4 - Kostní morfogenetický protein 4 (Bone morphogenetic protein 4)

CAF - Nádorově asociovaný fibroblast (Cancer-associated fibroblast)

CCL2 - Chemokin (C-C motif) ligand 2

CCL4 - Chemokin (C-C motif) ligand 4

CCL5 - Chemokin (C-C motif) ligand 5 (= RANTES)

CD271 - Diferenciační skupina 271(Cluster of differentiation 271)

CD8 - Diferenciační skupina 8(Cluster of differentiation 8)

CDF - Kontrolní dermální fibroblasty

CTLA-4 - Antigen 4 cytotoxických T-lymfocytů (Cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4)

CXCL1 - Chemokin motiv C-X-C ligand 1

CXCR1 - C-X-C motif chemokin receptor 1

CXCR2 - C-X-C motif chemokin receptor 2

DMEM - Dulbeckem modifikované Eaglovo medium(Dulbecco's modified Eagle's medium)

DNA - Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)

EDN3 - Endotelin-3

EGF - Epidermový růstový faktor (Epidermal growth factor)

FGF-2 - Fibroblastový růstový faktor 2 (Fibroblast growth factor 2)

G-CSF - Faktor stimulující kolonie granulocytů (Granulocyte-colony stimulating factor)

HGF - Hepatocytární růstový faktor (Hepatocyte growth factor)

IFN - Interferon

IGF2 - Inzulínu podobný růstový faktor (Insulin-like growth factor 2)

IL (2,6,8,13,11) - Interleukin (2,6,8,13,11)

IL-1RA - Interleukin 1 receptor antagonist

K14 - Keratin 14

Kerat - Keratinocyt

Ki67 - Antigen KI-67

LMM - Lentigo maligna melanom

MAF - Melanom asociované fibroblasty

MAPK - MAP kináza (Mitogen-activated protein kinase)

MDSC - Myeloidní supresorová buňka (Myeloid-derived suppressor cell)

MiTF - Mikroftalmie asociovaný transkripční faktor (Microphthalmia-associated transcription factor)

MM - Maligní melanom

MφM1 - Makrofág M1

MφM2 - Makrofág M2

NGF - Nervový růstový faktor (Nerve growth factor)

NK - NK buňka (Natural killer)

PD-1 - Programmed cell death protein 1

PDT - Fotodynamická terapie (Photodynamic therapy)

RANTES - Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (= CCL5)

SMA - Hladký svalový aktin (Smooth muscle actin)

TGF-beta - Transformující růstový faktor beta (Transforming growth factor beta)

TNF-alfa - Nádory nekrotizující faktor (Tumor necrosis factor)

Treg - Regulační T-lymfocyt (The regulatory T cell)

UV - Ultrafialové (Ultraviolet)

VEGF - Vaskulární endotelový růstový faktor (Vascular endothelial growth factor)

VEGF-R1/R2 - Receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor (Vascular endothelial growth factor receptor)



## Obsah

Prohlášení: .....	2
Abstrakt .....	3
Abstract .....	4
Poděkování .....	6
Seznam zkratek: .....	7
Úvod .....	10
Kožní nádory .....	10
Maligní melanom .....	11
Nemelanomové nádory kůže .....	19
Nádorová biologie .....	22
Ekologie nádorových buněk .....	22
Nádorové mikroprostředí .....	23
Nádorově asociované fibroblasty .....	25
Melanom-asociované fibroblasty .....	27
Glykobiologie .....	29
Systémové změny .....	29
Cíle práce .....	32
Experimentální metody a materiály .....	33
Výsledky .....	35
Studium původu CAF ve vztahu k primární nádorové populaci .....	36
Studium interakcí mezi CAF a hlavními buňkami epidermis – keratinocyty. ....	37
Studium interakcí mezi nádorovými buňkami a fibroblasty. Studium signálních změn pozorovaných <i>in vitro</i> ve srovnání s se změnami <i>in vivo</i> u pacientů s kožními nádory. ....	38
Studium možností ovlivnění transformace fibroblastů v CAF .....	41
Diskuse .....	42
Splnění cílů disertační práce .....	47
Seznam literatury .....	48

## **Úvod**

Tato disertační práce se věnuje tématu biologie kožních nádorů a mezibuněčným interakcím buněk nádorových a nenádorových. V teoretickém úvodu do problematiky uvádíme nejprve přehled nejvýznamnějších kožních nádorů a dále přehled biologie kožních nádorů vzhledem k publikacím, které jsou podkladem disertační práce.

## **Kožní nádory**

Nádor lze charakterizovat z řady perspektiv. Z pohledu buněčné biologie lze nádor popsat jako transformaci buněčných populací s autonomním růstem a invazivním chováním. Z pohledu molekulární biologie lze identifikovat genetické abnormality vyskytující se typicky u řady nádorů. Na začátku milénia byly navrhnuty jednotící znaky vyskytující se u většiny tumorů – soběstačnost nádoru díky růstovým faktorům podporujících růst, necitlivost vůči inhibičním růstovým signálům, unikátní apoptóze, neomezený replikační potenciál, podpora angiogeneze a schopnost šíření a metastazování (Hanahan and Weinberg , 2000).

Tumory nejsou primárně tvořeny pouze nádorovými buňkami. Přesnější je popis přirovnávající tumor k samostatnému orgánu neboli komplexu vlastních nádorových buněk a dále nenádorových buněk umožňující zachování, růst a šíření tumoru. Nově tvořené cévy umožní expanzi tumoru tím, že zajišťují adekvátní nutritivní zásobení a oxygenaci (Lichtenberger et al., 2010). Tumor podporuje vhodná mezibuněčná matrix, lymfatické cévy a řada buněčných populací. Souhrnně se jedná o nádorové mikroprostředí (Egeblad et al., 2010a). Ukazuje se, že komunikace mezi nádorovými a nenádorovými buňkami, jako jsou například fibroblasty, makrofágy a endotelové buňky, jsou významné pro biologické chování tumoru. Nenádorové buňky jsou ovlivňovány růstovými faktory z buněk nádorových, které ale komunikují recipročně a ustanovuje se komplexní komunikace stroma-nádor (Colegio et al., 2014). Maligní onemocnění v širším kontextu organismu je předmětem studia nádorové ekologie. Mezibuněčné interakce mezi buňkami kožních nádorů a buňkami nádorového mikroprostředí jsou předmětem této disertační práce.

Kožní nádory jsou primárně klasifikovány podle mikroskopického nálezu při histopatologickém vyšetření. Postupně tento zlatý standart doplňují metody analýzy DNA, transkriptomu a expresního profilu nádorů. Nejčastější kožní nádory jsou basocelulární a dlaždicový karcinom, které se někdy nazývají „nemelanomové“ tumory. Navzdory zařazení

pod tento zastřešující termín mají celou řadu odlišností. Cílem je tyto časté tumory odlišit od vzácnějšího ale výrazně rizikovějšího kožního nádoru – maligního melanomu.

U epidemiologicky nejvýznamnější kožních nádorů lze poukázat na společný významný rizikový faktor. Tím je UV (Ultrafialové) záření, které může indukovat melanom jednak v kumulativní dávce za celý život jedince, ale ještě více je riziková nárazová intenzivní expozice spojená se vznikem solární dermatitidy (D'Orazio et al., 2013). Poškození kůže UV zářením zvyšuje šanci na vznik melanomu dlouhodobě a častokrát dojde k vzniku nádoru mnoho let po expozici. Hlavní buňky chránící kůži před ionizujícím UV zářením jsou melanocyty. Melanocyty, které jsou poměrně pravidelně rozptýleny v bazální vrstvě epidermis, zásobují keratinocyty UV absorbujícím pigmentem melaninem. Melanin slouží keratinocytům k ochraně buněčného jádra, tedy místa nejvíce citlivého na UV indukované poškození. Spolupráce keratinocytů a melanocytů tak zajišťuje ochranu organismu před UV zářením (Archambault et al., 1995). Přes masivní vliv UV světla na patofyziologii melanomu existují i formy nádoru vznikající v částech těla neosvětlených, jako například slizniční melanom. I tak lze preventivně zlepšit incidenci kožních nádorů fotoprotekcí. Vzhledem k tomu, že lidé získávají významnou část životní kumulativní dávky UV záření v dětství, představuje fotoprotekce u dětí důležitou prevenci melanomu. (Volkmer and Greinert, 2011)

## **Maligní melanom**

Maligní melanom (MM) je zhoubný kožní nádor, který představuje v pozdních stádiích nepříznivý tumor, jehož výskyt kontinuálně celosvětově stoupá (Forsea et al., 2012b). V posledních desetiletích je pozorován až několikanásobný nárůst incidence MM (Fitzmaurice et al., 2015). Kožní MM je pátá nejčastější malignita u žen a šestá nejčastější u mužů. Incidence kožního MM na 100 000 obyvatel v ČR v období 1970-2008 narostla o více jak 600% (Vranova et al., 2014). Přehled změny roční incidence a mortality v tomto období ukazuje vzhledem k TNM klasifikaci Tabulka 1 a vzhledem k věkovým skupinám Tabulka 2.

*Tabulka 1 Odhadovaná procentuální změna roční incidence a mortality kožního melanomu vzhledem k TNM klasifikaci v ČR v období 1977-2008 (Vranova et al., 2014)*

TNM klasifikace	Odhadovaná procentuální roční změna incidence		Odhadovaná procentuální roční změna mortality	
	Muži	Ženy	Muži	Ženy
T1	37.22 %	38.65 %	3.67 %	2.96 %
T2	11.78 %	10.90 %	2.56 %	2.14 %
T3	11.05 %	8.19 %	4.92 %	3.84 %
T4	5.66 %	4.15 %	4.16 %	2.33 %

*Tabulka 2 Odhadovaná procentuální změna roční incidence a mortality kožního melanomu vzhledem k věkovým skupinám v ČR v období 1977-2008 (Vranova et al., 2014)*

Věkové kategorie	Odhadovaná procentuální roční změna incidence		Odhadovaná procentuální roční změna mortality	
	Muži	Ženy	Muži	Ženy
20–29	4.53 %	12.16 %	-0.75 %	-0.75 %
30–39	13.24 %	22.29 %	-2.62 %	-1.31 %
40–49	29.30 %	50.61 %	-0.88 %	2.10 %
50–59	72.67 %	78.51 %	2.46 %	6.85 %
60–69	262.81 %	125.44 %	26.09 %	11.57 %
70–79	1058.83 %	205.08 %	95.64 %	35.97 %
80 +	1824.21 %	250.89 %	303.66 %	77.94 %

MM je onemocnění se stále poměrně nepříznivou prognózou. Efektivní možnosti terapie významně omezené při pokročilém stádiu onemocnění (Kalal et al., 2017). Poměrně výrazných rozdíl v prognóze raného a pokročilého MM vede na jedné straně k velké snaze preventivního zachytu časných tumorů a zároveň je výrazná snaha zlepšit prognózu pokročilých a metastazujících MM (Garbe et al., 1995).

## **Klinické varianty maligního melanomu**

### ***Superficiálně šířící se MM***

Superficiálně šířící se MM je nejčastější histopatologický typ tohoto nádoru – představuje zhruba 70 % všech MM. Přes 60 % superficiálně šířících se MM je zachyceno v příznivém stadiu onemocnění, kdy je hodnota Breslow menší nebo rovna 1 mm. (Lasithiotakis K. G. et al., 2006) Nově vzniklý tumor se objevuje ve 30 % transformací již existujícího benigního névu a v 70 % *de novo* bez přítomnosti prekursorového névu (Pampena et al., 2017).

Klinickým obrazem je typicky nepravidelně pigmentovaná makula nebo nízká papula s nepravidelnými okraji a barevnými změnami charakteru červených, šedých, modrých nebo černých okrsků (American Academy of Dermatology Ad Hoc Task Force for the ABCDEs of Melanoma et al., 2015).

### ***Nodulární MM***

Nodulární MM představuje 2. nejčastější variantu s výskytem 15-30 % mezi všemi melanomy (Lasithiotakis et al., 2006). Klinický vzhled je obvykle tmavě pigmentovaná papula nebo nodulus, někdy až undulující. Často je přítomna uniformní pigmentace nebo naopak narůžovělá depigmentace, symetrické okraje a relativně malý průměr. Vzhledem obdobnému fenotypu jako benigní kožní afekce představuje tento fenotyp diagnostické obtíže v primární prevenci (Demierre et al., 2005, Warycha et al., 2008). Nejenom obtížněji rozpoznatelný fenotyp, ale také morfologie nodulárního MM přináší nepříznivou prognózu, neboť většina nodulárních MM má v době diagnózy hodnotu Breslow více jak 2 mm. Z jiného úhlu pohledu lze konstatovat, že ze všech podtypů MM jsou ty, které mají Breslow větší jak 2 mm, více jak z poloviny tvořeny nodulárním subtypem (Demierre et al., 2005).

### ***Lentigo maligna melanom***

Lentigo maligna melanom (LMM) je subtyp typicky se vyskytující na kůži, kde byla za život chronická intermitentní expozice slunečnímu záření (Clark Jr. and Mihm Jr., 1969). Tvoří 4-15 % MM. Po vzniku pigmentované makuly dochází k jejímu postupnému zvětšování v řádu měsíců až let s rozvojem dalších dysplastických znaků jako asymetrie pigmentace a okrajů až

vznik elevace, která značí vertikální růst nádoru. Typicky se LMM objevuje u starších pacientů v oblasti hlavy, případně na krku. (Swetter et al., 2005)

### ***Akrolentiginózní melanom***

Akrolentiginózní melanom představuje do 5 % všech melanomů. Jedná se o nejčastější typ MM v populacích Afričanů a Afroameričanů. Nejčastěji se vyskytuje na dlaních, ploskách nohou a v oblasti nehtů. Typický vzhled je nově vzniklá sytě pigmentovaná až černá makula, nepravidelného zbarvení a tvaru (Coleman 3rd et al., 1980).

### ***Další varianty***

Amelanotický melanom – tato varianta se může vyskytovat už všech základních typů melanomů, představuje cca 2-8 % MM. Vzhledem k červenému až růžovému zbarvení představuje tato varianta obtížně diagnostikovatelný nádor, který může být zaměněn za benigní lézi (Jaimes et al., 2012).

Desmoplastický melanom – jedná se o vzácnou variantu melanomu, která se obvykle vyskytuje na kůži s chronickou expozicí UV záření. Desmoplastický melanom je obtížné diagnostikovat, jak klinicky pro svou častou amelanotičnost a dermální růst, tak histologicky, kdy může být zaměněn za řadu benigních lézí (Chen et al., 2013).

### **Prognostické faktory**

Navzdory příznivé prognóze raných stádií MM představuje pokročilé stadium velmi závažné onemocnění s výrazně nepříznivou prognózou.

Nejdůležitější faktor ovlivňující prognózu MM je hloubka invaze. Histologicky se hodnotí pod Breslowa – vzdálenost v milimetrech od stratum granulosum po nejhlouběji uloženou nádorovou buňku. Další významné charakteristiky nádoru pro prognózu jsou mitotický index (množství mitóz/mm<sup>2</sup>) a přítomnost ulcerace nádoru. Při hodnotě Breslow pod 1 mm (T1 stadium) je 10leté přežití na úrovni 92 %. S rostoucí hodnotou Breslow se poměrně prudce zhoršuje prognóza MM, kdy T4 stadium představuje hodnotu Breslow větší než 4 mm s 10letým přežitím do 50 %. Dále je hodnoceno metastatické postižení lymfatických uzlin a

přítomnost vzdálených metastáz. Při postižení uzlin klesá 10leté přežití cca na 35 %. V případě vzdálených metastáz přežije déle než rok pouze okolo 30-60 % pacientů (Balch et al., 2009).

Z pohledu nádorové biologie se experimentálně ukazuje prognosticky nepříznivým znakem zvýšené imunosupresivní prostředí v místě nádoru, například při větším množství Treg lymfocytů (Gray et al., 2017). Ovlivnění imunitní reakce organismu je jedním z obecných vlastností progredujících tumorů. U MM se toto může dít i díky interakcím s mezenchymovými kmenovými buňkami (Duffy et al., 2011). MM může atrahovat migraci mesenchymálních kmenových buněk, které jsou jedním z hlavních zdrojů nádorově asociovaných fibroblastů (CAF) (Watts and Cui, 2012).

Pokročilý MM představuje stále obtížně léčitelné onemocnění s nepříznivou dlouhodobou prognózou navzdory velkému pokroku v porozumění nádorové biologii a pokroku v terapii a diagnostice. V poslední letech se již do praxe dostává moderní terapie, která je schopna zlepšit prognózu pokročilého MM, ale bohužel stále jen v podobě paliativní farmakoterapie, která prodlužuje přežití a kvalitu života pacientů, ale prozatím nepřináší šanci na plné vyléčení.

## **Genetika maligního melanomu**

U MM se vyskytují somatické mutace velmi často ve srovnání s ostatními tumory, ale úroveň a typ mutací je vysoce variabilní mezi jednotlivými pacienty (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Poškození DNA je typicky indukováno UV expozicí, a to jak chronickou, tak i intenzivní intermitentní. U MM hlavy, krku nebo horních končetin se vyskytují mutace ve vysoké míře. MM trupu a dolních končetin mají menší frekvenci mutací než předchozí skupina. Vůbec nejmenší četnost somatických mutací je popisována u MM akrálních, slizničních a uveálních (Curtin. et al., 2005). Maligní nádory obecně mají zvýšenou tendenci ke vzniku genetických mutací, a tak se často stávají heterogenními masami buněk s variabilním podílem různých klonů. Toto je i případ MM (Tirosh et al., 2016). Popisuje se řada významných mutací ovlivňující chování a progresi. U poloviny MM se vyskytuje BRAF mutace, cca až u čtvrtiny NRAS mutace a zhruba u 15 % MM NF1 mutace (Luke et al., 2017). Existence těchto proto-onkogenů umožnila pokrok v terapii.

Dále je stále objevována řada další molekulárních změn a interakcí, které se mohou vyskytovat u MM. Kmenové vlastnosti melanomových buněk jsou udržovány interakcí mezi receptorem CD271 a nervovým růstovým faktorem (Redmer et al., 2014). Transkripční protein

Nodal byl popsán u změny růstové fáze MM. Vertikální fáze růstu, která představuje nepříznivý prognostický znak, byla spojena s nárůstem množství Nodal-pozitivních buněk (Seftor et al., 2014). U Nodal-pozitivních buněk byl rovněž popsán vliv mikroprostředí na jejich chování a morfologii (Topczewska et al., 2006). Významný regulační gen zapojený do vývoje melanocyty i onkogeneze MM, který byl na zvířecích modelech prokázán v buňkách mikroprostředí MM, je MiTF (Mikroftalmie asociovaný transkripční faktor) ovlivňující expresi morfogenu EDN3 (endotelin-3). Byl prokázán vliv na migraci i na proliferaci melanomových buněk (Vachtenheim and Ondrusova., 2015).

Jak již bylo zmíněno výše, interakce s buňkami organismu mají vliv na chování MM. Například progres MM je spojena s prokázanými změnami v okolním mikroprostředí. Jedním z průkazů vlivů MM na keratinocyty je ovlivnění mezibuněčných spojů změnou expresního profilu pro connexiny (Haass et al., 2010a). Keratinocyty mohou podporovat agresivitu MM například zvýšenou produkcí lamininu (Chung et al., 2011) a nebo mohou aktivací signální dráhy Notch nastartovat přechod do méně příznivé vertikální fáze růstu (Golan et al., 2015). Při poškození UV zářením dochází k poškození keratinocytů, a vznik zánětlivé reakce spojené se syntézou řady parakrinních mediátorů jako např. IL-6 (Interleukin 6), IL-8, IL-11, TNF-alfa (tumor nekrotizující faktor alfa) může vlivem na melanocyty iniciovat transformaci do melanomových buněk (Brenner et al., 2005)

## Terapie

Metodou volby při zjištění MM je chirurgická excize. Diagnóza je stanovena na základě histologického nálezu, který je proveden z průbojníkové biopsie u málo suspektních projevů nebo z neširoké excize u suspektních projevů. U histologického hodnocení je klíčová hodnota Breslow, přítomnost ulcerace, množství mitóz, známky regrese a vyšetření okrajů resekátu (Garbe et al., 2011). Dle histologického nálezu je následně určen definitivní chirurgický zákrok, kdy se provádí resekce okrajů v rozsahu 1-2 cm (Cascinelli, 1998). Pro určení metastatického postižení v lymfatických uzlin se provádí exstirpace sentinelové uzliny. Obecně je tento zákrok doporučován u MM s hodnotou Breslow nad 1 mm. U hodnot menších než 1 mm je indikace vyšetření sentinelové uzliny zvažována dle ostatních rizikových faktorů (Han et al., 2013). V případě metastatického postižení sentinelové uzliny je indikována spádová lymfadenektomie. Je-li nález negativní, není lymfadenektomie indikována, protože nepřináší benefit stran snížení pravděpodobnosti relapsu onemocnění, a pacienti jsou ušetřeni častých



negativních komplikací spojených s lymfadenektomií (Cochran et al., 2000). Po chirurgické excizi, případně po exenteraci, bývá u rizikových pacientů indikována adjuvantní imunoterapie interferonem- $\alpha$ . Při podávání interferonu- $\alpha$ 2b dochází ke snížení množství recidiv onemocnění a zvýšení přežití u pacientů s mikrometastatickým postižením. Největší benefit je pozorován u pacientů s ulcerovaným melanomem (Eggermont et al., 2012).

Při progresi onemocnění s rozvojem metastatického postižení byla do nedávné doby aplikována paliativní chemoterapie, případně paliativní radioterapie. V posledních letech se objevují nové možnosti terapie metastatického MM jednak ve formě imunoterapie a dále v podobně cíleného ovlivnění onkogenních drah v podobě B-Raf inhibitorů a MEK inhibitorů (Dummer et al., 2015).

- Anti-CTLA-4 (ipilimumab) je lidská monoklonální protilátka vyvinutá k blokování CTLA-4 receptoru na T-lymfocyty, čímž je umožněno aktivování a proliferace T-lymfocytů (Weber et al., 2008, Leach et al., 1996).
- Anti-PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) je protilátka proti receptoru PD-1 (Programmed cell death protein 1). Ten se vyskytuje ve formě dvou ligandů (PDL-1, PDL-2) na řadě buněk včetně APC a nádorových buněk a svojí vazbou na T-lymfocyty snižuje jejich aktivitu (Dolan and Gupta, 2014, Keir et al., 2008, Ishida et al., 1992).
- Cílem terapie B-RAF inhibitorů (vemurafenib, dabrafenib) je ovlivnění mutace proto-onkogenu BRAF. Inhibitory cílí specificky na buňky s pozitivitou BRAF V600E (Bollag et al., 2010, Davies et al., 2002).
- Aktivovaný B-Raf protein aktivuje proteiny MEK1, MEK2 které následně aktivací MAPK(MAP kináza) podporují proliferaci nádoru. MEK inhibitory (trametinib) tuto dráhu blokují.
- . Cílem kombinované terapie BRAF+MEK inhibitory je snížení vzniku resistance nádoru na terapii. Progrese onemocnění spojená se selháním terapie BRAF inhibitory se často vyskytuje do 6 měsíců (Chapman et al., 2011). Dvě třetiny případů resistance jsou způsobeny aktivací onkogenní dráhy MAPK (Van Allen et al., 2014).

Obecná role imunitního systému v patofyziologii MM je předmětem hledání vhodné terapeutické modality. K uvažovaným cestám patří například eliminace Treg lymfocytů v MM, kde se jeví nadějně například aplikace cyklofosfamidů, IL-2 nebo anti-Treg imunoterapie (Ouyang et al., 2016). Jedna z popsanych interakcí, která může představovat naději na zlepšení terapie MM je interakce mezi signálními drahami Nodal a Notch. Tyto signální dráhy, které se

uplatňují při embryonálním vývoji, jsou v experimentech schopné snížit agresivitu melanomových buněk (Strizz et al., 2011).

## **Nemelanomové nádory kůže**

Nemelanomové nádory kůže patří vůbec k nejčastějším malignitám. V roce 2015 bylo v ČR hlášeno celkem 27 392 těchto malignit, což tvoří 1/3 všech zjištěných zhoubných nádorů v daném roce. Dvěma hlavními jednotkami této skupiny jsou basocelulární a dlaždicové karcinomy. Míra incidence je tradičně mírně vyšší u mužů, dalšími rizikovými faktory pro obě diagnostické jednotky je světlý fototyp kůže, věk jedince a dlouhodobá kumulativní expozice UV záření. Vzhledem k relativně příznivé prognóze a velké incidenci bývají tyto malignity tradičně vyřazovány z populačních analýz výskytu zhoubných nádorů, aby nedocházelo ke zkreslení informací o onkologických onemocněních jako celku (Han et al., 2006).

### **Basocelulární karcinom**

#### ***Klasifikace***

Zhruba 70 % bazocelulárních karcinomů se vyskytuje na obličeji a hlavě. Další v řadě lokalit jsou trup, končetiny, případně vzácněji genitál. Nodulární bazaliom je nejčastější klinická varianta. Tvoří 60 % případů a je typicky vzhledu růžové papuly často s teleangiektasiemi. Ulcerace nejsou vzácností. Ulcerující bazaliom se nazývá klinicky ulcus rodens. Superficiální basaliom tvoří cca 30 % případů. Klinicky se projevuje šupící se makulou až ložiskem světle červené až růžové barvy. Někdy může být přítomná i hnědá nebo černá pigmentace. Sklerodermiformní bazaliom tvoří cca 5 % bazaliomů. Projevuje se nerovným, tuhým ložiskem barvy kůže s teleangiektasiemi. Připomíná jizvu nebo ložisko sklerodermie (Di Stefani and Chimenti, 2015).

#### ***Terapie***

Před volbou léčebného postupu se bazaliomy rozdělují podle prognostických faktorů do 3 skupin – nízce, středně a vysoce rizikové. Prognostické faktory jsou velikost a lokalizace tumoru, histologický subtyp, ohraničení, anamnéza předchozího léčení a celkový stav pacienta. Obecně v případě příznivé klinické situace je primárně doporučována chirurgická excize s okraji zdravé kůže od 3 mm až několik cm. Dále je případně indikována kryoterapie, kyretáž, laserová ablace, léčba topickými farmaky (5-fluoruracil, imiquimod, ingenol mebutát), fotodynamická terapie (PDT), případně radioterapie. V případě recidivujících a pokročilých

bazaliomů se uplatňují radikální chirurgické zákroky, imunoterapie (vismodegib), chemoterapie, a radioterapie (Trakatelli et al., 2014, Alter et al., 2015).

### **Prognóza**

Prognóza je příznivá. Incidence lokální recidiv je závislá na histologickém subtypu a zvolené léčebné modalitě. Zhruba u 44 % pacientů se do 3 let od diagnózy objevuje nový bazaliom v jiné lokalitě (Marcil and Stern, 2000). Bazocelulární karcinom může velmi vzácně metastazovat. Incidence progresu do metastazujícího onemocnění se pohybuje v rozsahu 0,003 % - 0,1 % ze všech zachycených bazaliomů. V případě metastazujícího bazaliomu je v posledních letech k dispozici preparát vismodegib ovlivňující antagonisticky hedgehog signální dráhu vazbu na SMO receptor (Sekulic et al., 2012, von Domarus and Stevens, 1984).

### **Dlaždicový karcinom**

#### **Klasifikace**

Aktinická keratóza je kožní léze obecně považována za premalignitu dlaždicového karcinomu. Progrese z aktinické keratózy do karcinomu je popisována v četnosti 0 % - 0,075 % transformovaných lézí/rok a je tedy stále předmětem studií. Typicky se projevuje deskvamující růžovou papulou s erytematozní spodinou. Na rtech se může vyskytovat v podobě aktinické cheilitidy (Markopoulos et al., 2004, Werner et al., 2013).

Dlaždicový karcinom *in situ* se na kůži označuje jako morbus Bowen. Léze je většinou růžové barvy, někdy s pigmentem, nejasně ohraničená a plochá. V oblasti glans penis má karcinom *in situ* většinou vzhled sytě červeného až sametového ložiska bez přítomnosti deskvamace – jedná se o erytroplasii dle Queyrata (Graham and Helwig, 1973).

Dlaždicový karcinom je klinicky poměrně různorodý, kdy úroveň diferenciací léze koreluje s klinickým nálezem. Dobře diferencované tumory jsou obvykle tuhé papuly až plaky se šupinami. S poklesem diferenciací se objevují známky ulcerace, krvácení, ztráty deskvamace a tuhosti projevu (Fernandez Figueras, 2017). Typickým varovným znakem je perzistující vřed nebo dlouho se hojící rána v terénu chronické UV expozice (Martens et al., 2018).

U dlaždicového karcinomu se objevují metastázy častěji než u bazaliomu. Incidence metastáz je zhruba 2-2,5 % ze všech dlaždicových karcinomů (Brougham et al., 2012). Riziko vzniku metastazování roste přímo úměrně s tloušťkou nádoru, zvýšené riziko je pozorováno u tloušťky na 2 mm, vysoké riziko (high-risk) u tloušťky nad 6 mm (Brantsch et al., 2008). Mezi další rizikové faktory patří hloubka invaze, velikost nad 2 cm, perineuralní invaze, dediferenciace, desmoplastický růst, lymfovaskulární invaze, lokalita v oblasti rtu a ucha a případně celková imunosuprese pacienta (Motaparthy et al., 2017).

### ***Terapie***

V léčbě se uplatňují chirurgické excize, radioterapie, laserová terapie, fotodynamická terapie, kryoterapie, farmakoterapie (floururacil, imiquimod) případně chemoterapie. Hierarchie terapeutických modalit je stále předmětem studií a diskuzí a většinou hraje roli zkušenost pracoviště a dostupnost různých druhů léčby. Nejčastěji se uplatňuje chirurgická excize (Lansbury et al., 2013).

### ***Prognóza***

Prognóza primárních tumorů je velmi dobrá. 5 let po léčbě je úplná remise pozorována u více jak 90 % pacientů. Relapsy onemocnění se v 75 % případů objevují do 2 let od léčby (Rowe et al., 1992).

## **Nádorová biologie**

### **Ekologie nádorových buněk**

Solidní tumory již nejsou považovány pouze za konglomerát nádorových buněk, ale představují spleť strukturu jak buněk nádorových, tak mikroprostředí tvořeného z buněk stromálních a extracelulární matrix (Egeblad et al., 2010b). Vliv nádorového mikroprostředí na vlastnosti tumoru podporuje pohled na nádor jako na systémové onemocnění (Gershenwald et al., 2017, Mocellin et al., 2008). Vzájemné interakce všech složek tvořících nádory jsou velmi složité. Soubor nádorových buněk, buněk tvořících nádorové mikroprostředí, imunitního systému i funkce ostatních systémů organismu tedy vytváří nesmírně komplexní soubor vztahů, a tak lze strukturu nádoru charakterizovat jako ekosystém (Kareva, 2011).

V poslední době se těmto vztahům přikládá čím dál tím větší význam v souvislosti s rozvíjejícím se odvětvím nádorové ekologie. Principy známé již od přijetí evoluční teorie a obecně platné v ekosystému živočichů i rostlin se v podobné míře pravděpodobně uplatňují i u nádorové tkáně (Lacina et al., 2019). V ekologii představuje evoluční tlak nehostinnost prostředí, predátoři a inter a intradruhovú kompetice. Adaptaci organismů představuje variabilní nadpočetné množství potomstva se schopností přenášet geneticky a epigeneticky úspěšné vlastnosti dalším generacím a nepředvídatelný vznik spontánních genetických mutací. V ekologii nádorové buňky můžeme pozorovat velmi podobné mechanismy, kde dobře fungující organismus s kompetentním imunitním systémem představuje vysoce hostilní prostředí pro potenciální nádorové bujení. Následně však při zhoršení protinádorového dohledu nebo při vzniku vysoce „solistikované“ nádorové buňky schopné uniknout obranyschopnosti organismu nastupuje patofyziologický mechanismus nádorové masy velmi blízký evolučním mechanismům. A pokud selekční tlak organismu nevede k likvidaci tumoru, může jen podporovat vznik více „solistikovaných“ nádorových populací, a tedy větší agresivitu nádorového onemocnění. Imunitní systém představuje zásadní obranný mechanismus dohledu nad geneticky abnormálními buňkami (Amend and Pienta, 2015, Kareva, 2011).

Z pokusů v tkáňových kulturách bylo prokázáno, že nádorové buňky prosperují v mikroprostředí podporujícím buněčnou proliferaci, lokální invazivitu a vznik metastáz. (Allen and Jones, 2011). A zároveň i naopak jsou buňky mikroprostředí ovlivňovány nádorovými buňkami na epigenetické a genetické úrovni (Polyak et al., 2009). V současné době je u živočichů včetně člověka považováno nádorové stroma za významnou složku maligních

nádorů. Tato složka mikroprostředí může signifikantně ovlivnit biologické vlastnosti nádorů včetně metastatického šíření (Smetana Jr. et al., 2013b). Zároveň i v rámci ekosystému nádorů je například prokázán vliv stromatu na udržování funkčnosti kmenových nádorových buněk (Borovski et al., 2011).

### **Nádorové mikroprostředí**

Jednou z významnějších buněčných populací tvořících stroma maligních nádorů jsou fibroblasty (Smetana Jr. et al., 2013b), přesněji nádorově asociované fibroblasty (CAF). Na buněčné úrovni tedy buňky imunitního systému a CAF představují hlavní zástupce ovlivňující prorůstové prostředí sekrecí faktorů jako cytokiny, chemokiny nebo růstové faktory spolu s tvorbou extracelulární matrix (Plzak. et al., 2010a). Biologické vlastnosti nádorové populace ovlivňují mimo imunitních buněk a CAF také například buňky endotelu (Plzak et al., 2010b, Smetana et al., 2013b).

Významný efekt mikroprostředí byl pozorován u MM. Vzhledem k vysoké agresivitě tumoru s rostoucí incidencí a omezenými možnostmi léčby v pokročilých stádiích onemocnění je velmi podrobně studován (Forsea et al., 2012a). Důležitost mikroprostředí pro melanomové buňky byla zjištěna při pokusech, kde byly melanomové buňky transplantovány do embrya obratlovců, kde melanomové buňky získávají vlastnosti melanocytárních prekursorů (buněk neurální lišty) (Kulesa et al., 2006b), zároveň melanomové buňky ztrácejí agresivitu (Kulesa et al., 2006a) a obecně lze říci, že embryonální mikroprostředí zde eliminuje schopnost melanomových buněk vytvářet nádor (Kulesa et al., 2006b).

V pokusech bylo pozorováno, že melanomové buňky jsou schopné ovlivnit normální keratinocyty *in vivo* a *in vitro* (Haass et al., 2010; Kodet et al., 2015). Zároveň aktivované keratinocyty jsou schopné ovlivnit migraci melanomových buněk (Keswell et al., 2012). Mezibuněčné interakce mezi různými typy buněk v MM (Kodet et al., 2013b, Kodet et al., 2015) mohou být významným mechanismem pro obecnou nádorovou biologii.

Mezi nádorovou patofyziologií a patofyziologií hojení a reparace organismu lze najít celou řadu paralel. Nachází se mnohé společné znaky mezi kmenovými buňkami a nádorovými buňkami a je obecně pozorován společný význam mikroprostředí, například pokusy osvětlujícími roli epitelově-mesenchymálních interakcí při hojení (Dvorak, 1986, Gal et al., 2011, Klima et al., 2009).

Obecně lze konstatovat, že k udržení homeostázy lidského organismu je nezbytné zachování dobře fungujících tkání a orgánů, a i reparace v případě patologického procesu. Pro

hojení a obnovu buněčných populací je nezbytná role kmenových buněk. Přítomnost kmenových buněk byla zjištěna ve všech lidských tkáních. (McCracken et al., 2016).

Správné fungování reparace za účasti kmenových buněk je založeno na jejich interakci s již diferencovanou okolní tkání, přesněji jejich interakcí s mikroprostředím poškozené tkáně. Ukazuje se tedy, že nejen správně fungující kmenové buňky jsou podstatné pro hojení, ale rovněž je významný vliv mikroprostředí, ve kterém zasahují (Weigelt and Bissell, 2008) .

Dnes již modelovým příkladem lokality, kde se se uplatňují významné mezibuněčné interakce mezi diferencovanou tkání a skupinami kmenových buněk, je prostředí vlasového folikulu, tzv. vlasový „*bulge*“. Vlasový *bulge* představuje poměrně složitý systém, kde nacházíme několik různých populací kmenových buněk. Jsou zde kmenové buňky neuroektodermového původu, které slouží jako prekursori pro obnovu melanocytů (Sieber-Blum et al., 2004). Další populací významnou pro hojení kůže, kterou nacházíme v okolí vlasového folikulu, představují populace epidermálních kmenových buněk (Lavker et al., 2003). Vlasový folikul tímto představuje velmi zajímavou strukturu, kde spolupracují dvě relativně vývojově vzdálené kategorie kmenových buněk. Důmyslnou koordinaci všech buněčných systému vlasového folikulu dokládá i cyklická aktivita růstu vlasu, kde se mnohokrát za život jedince střídá proliferační aktivita se stádiem klidu. A ukazuje se, že zde můžeme pozorovat interakce mezi oběma typy kmenových buněk, například je popsána role transkripčního faktoru NFIB (Chang et al., 2013).

Populace kmenových buněk se podílí jak na hojení a obnově dané tkáně, ale vznikají i buňky sloužící k udržení rezervních kmenových buněk pro další život organismu, někdy také nazývané *pool* kmenových buněk. Kmenové buňky v dospělosti častokrát představují populaci neaktivních „spících“ buněk, které přecházejí do aktivního stadia, při němž jsou schopny neomezeného dělení až po aktivaci vnějším stimulem. Populace aktivovaných kmenových buněk a jejich „spící“ klidové formy se u vysoce obnovujících se tkání vyskytují společně (Li and Clevers, 2010). Kmenové buňky u dospělých jedinců jsou pravděpodobně ve většině případů monopotentní, ale nelze zatím vyloučit jejich multipotentní potenciál za specifických nebo extrémních podmínek.

Poměr mezi aktivovanými a klidovými kmenovými buňkami představuje dynamickou rovnováhu. Na základě potřeby organismu může docházet k posunu k většímu množství aktivovaných buněk obstarávajících obnovu tkáně nebo naopak ke snížení proliferační aktivity,



kteřá napomáhá zachování funkčnosti „spících“ kmenových buněk. Ty pak neprocházejí četnými mitózami, a nehrozí tak vyšší riziko poškození DNA (Orth et al., 2012) .

V případě maligního melanomu je popsán těsný vztah k prekursoru melanocytů, tzv. buňkám neurální lišty. Neurální lišta je embryonální neuroektodermová struktura, která představuje zdroj kmenových buněk pro řadu tkání. Kmenové buňky z neurální lišty podstupují komplexní vývoj vedoucí k jejich zapojení do definitivních tkání, kde je klíčová nejen regulace migrace a diferenciaci, ale také správné načasování (Thiery and Sleeman, 2006). Melanomové buňky vznikající z melanocytů mají fenotypové změny, které jsou blízké fenotypu kmenových buněk neurální lišty. Tato dediferenciační paralela byla popsána obecně u řady tumorů. U MM je prokázána řada společných vlastností s kmenovými buňkami (Ivanov and Hei, 2015). Experimenty byla prokázána paralela mezi MM a kmenovými buňkami, kde dochází ke snížení maligního potenciálu melanomových buněk po implantaci do časného zvířecího embrya vlivem mikroprostředí, jež normálně ovlivňuje kmenové buňky neurální lišty (Kulesa et al., 2006b, Lee et al., 2005).

### **Nádorově asociované fibroblasty**

Nádorové stroma je významnou komponentou v rámci ekosystému nádoru a CAF představují hlavní populaci stromálních buněk. Oproti normálním fibroblastům jsou CAF odlišné v expresi 600 genů (Strnad et al., 2010b), objevuje se řada genetických abnormalit, mutací a ztráty heterozygosity. (Fukino et al., 2007, Hill et al., 2005). CAF izolované z lidských basocelulární kožních karcinomů a dlaždicových karcinomů hlavy a krku mají významně odlišnou genetickou expresi oproti normálním fibroblastům, včetně genů kódující pronádorové faktory, jako je IL-6 (Dvorankova et al., 2011a, Strnad et al., 2010a, Szabo et al., 2011a). Podobně jako samotné nádorové buňky ani CAF z nádorového stromatu nejsou homogenními klony, ale představují heterogenní populace (Sugimoto et al., 2006).

Morfologicky lze popsat CAF jako myofibroblastům podobné buňky charakteristické přítomností hladkého svalového aktinu (SMA) (Smetana Jr. et al., 2013a, b). Vznik CAF je stále předmětem zkoumání a doposud byla identifikována řada mechanismů, které by mohly vysvětlovat jejich původ. CAF mohou pocházet z okolního mesenchymu, kde byla na pokusech *in vitro* prokázána transformace fibroblastů v myofibroblasty vlivem TGF-beta 1 a galektinu-1 (Dvorankova et al., 2011b, Mueller et al., 2007). Řada prací poukazuje na možnost jejich vzniku z buněk kostní dřeně, konkrétně z mezenchymových kmenových buněk a z hematopoetických

kmenových buněk (Kabashima-Niibe et al., 2013, McDonald and LaRue, 2012, Quante et al., 2011). Jsou popsány endotelo-mesenchymové přechody, které nachází potenciální zdroj CAF v oblasti endotelu (Zeisberg et al., 2007). Jiné práce poukazují na možnost původu v pericytech (Sugimoto et al., 2006). Kmenové buňky z tukové tkáně, které se vyskytují u nádorů prsu v blízkosti nádorových buněk, pod vlivem TGF-beta 1 získají znaky myofibroblastů (Jotzu et al., 2011). V neposlední řadě je v mnoha pracích popisován epitelově-mesenchymový přechod z epitelu nádorových buněk (Kopantzev et al., 2010, Lopez-Novoa and Nieto, 2009, Petersen et al., 2003). Obecně lze tedy shrnout, že vznik CAF je experimentálně popisován z fibroblastů z okolní zdravé tkáně, z pericytů, endotelu a makrofágů a rovněž jako epitelově-mesenchymový přechod z nádorových buněk. (De Wever et al., 2008, Haviv. et al., 2009, Plzak et al., 2010a).

Význam CAF pro patofyziologii nádorů byl prokázán řadou experimentů. Pokusy v rámci naší pracovní skupiny bylo například v minulosti prokázáno, že stromální fibroblasty bazaliomu ovlivňují fenotyp keratinocytů (Lacina et al., 2007c). Na zvířecím modelu bylo zjištěno, že ozářené fibroblasty indukovaly vznik nádorů mléčné žlázy po transplantaci do normální myši (Barcellos-Hoff and Ravani, 2000). Význam CAF na patofyziologii tumorů je tedy postupně rozkrýváno. Stejně jako ostatní buňky nádorového mikroprostředí, tak i CAF jsou ovlivněné onkogenetickými procesy (Kurose et al., 2001). CAF mají pravděpodobně i vliv na resistenci nádorů na protinádorovou terapii. U MM byl popsán podobný efekt při vzniku resistance na BRAF inhibitory (Flach et al., 2011). V neposlední řadě byl sledován vliv na schopnost imunitního systému bránit se rozvíjejícímu nádoru, kde v pokusech s nádorově asociovanými fibroblasty z MM byla sledována schopnost potlačit aktivitu NK buněk a tím oslabit protinádorovou imunitu organismu (Balsamo et al., 2009).

Přechod fibroblastů do SMA exprimujících myofibroblastů je primárně stimulován transformujícím růstovým faktorem-beta1 (TGF-beta1), který je často zvýšený v séru pacientů s MM. V tomto kontextu byl rovněž publikován přídatný efekt endogenního lektinu (galektinu-1) (Dvorankova et al., 2011, Krasagakis et al., 1994, 1998).

V experimentech byl pozorován význam CAF na řadu modalit důležitých pro nádorovou patofyziologii. Podílí se na podpoře růstu a šíření tumoru a také pomáhají udržovat nízkou diferenciaci epitelových buněk jak samotného nádoru (Plzak et al., 2010b), tak i epitelů nenádorových. Příkladem je vliv na fenotyp normálních keratinocytů (Kolar et al., 2012). Význam na migraci a růst nádorových buněk bych prokázán i u řady nádorových typů (Smetana Jr et al., 2013b). Schopnost CAF ovlivnit normální epiteliální buňky byla například *in vitro* pozorována v pokusech s buňkami karcinomu prsu, kde normální epitelové buňky získaly

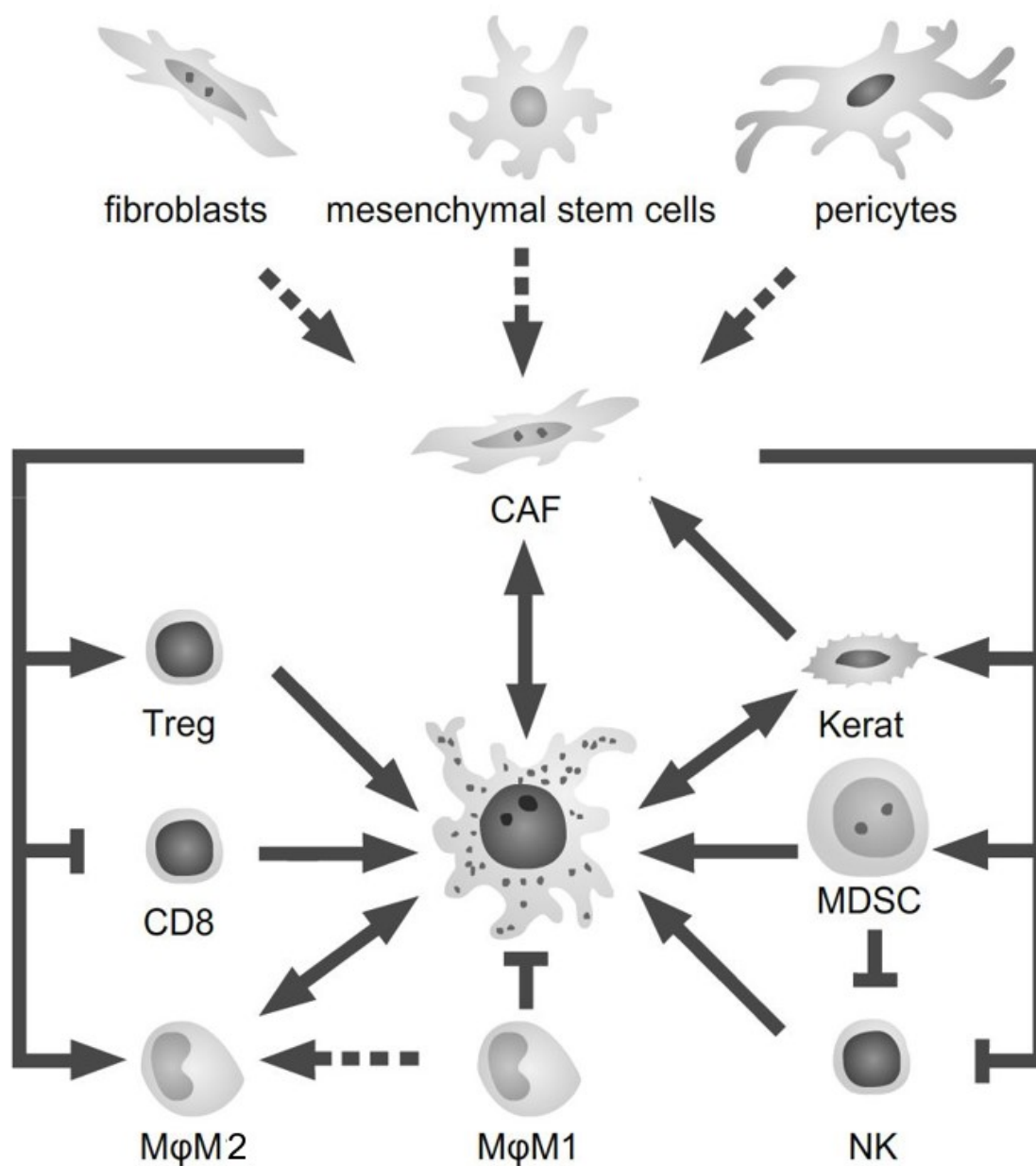
fenotyp buněk nádorových a zároveň byl pozorován vliv CAF na samotné buňky nádoru (Dvorankova et al., 2012, Lacina et al., 2007a,b).

CAF jsou parakrinně aktivní a mohou se podílet na zvýšených hladinách IL-6 a IL-8, které jsou pozorovány u progredujících tumorů (Mouawad et al., 1996, Yurkovetsky et al., 2007b). Z kokultivačních experimentů, kde byl pozorován efekt CAF na ostatní tkáň, byla zjištěna řada suspektní mediátorů, jako jsou např. IGF-2 (Inzulínu podobný růstový faktor 2), BMP4 (kostní morfogenetický protein 4), IL-6, IL-8, FGF-2 (Fibroblastový růstový faktor 2), CCL2 (chemokin C-C motif ligand 2), NGF (Nervový růstový faktor), TGF-beta and CXCL1 (Chemokin motiv C-X-C ligand 1) (Kolar et al., 2012, Plzak et al., 2010b, Szabo et al., 2011b). U TGF-beta 1 byl studován mechanismus vlivu na normální fibroblasty, kde v pokusech *in vitro* fungoval jako molekulární „switch“ pro vznik CAF z normálních fibroblastů (Brenmoehl et al., 2009). V některých populacích CAF byl dokonce zjištěn inhibiční vliv na růst tumoru (Augsten, 2014), z čehož se dá usuzovat, že mechanismus mezibuněčných interakcí nádorových buněk stromatu je komplexní.

### **Melanom-asociované fibroblasty**

CAF vyskytující se u MM se někdy označují jako melanom-asociované fibroblasty (MAF).. Byla popsána pestrá specifická biologická aktivita MAF a zároveň byl prokázán vliv na biologické chování a fenotyp melanomových buněk (Comito et al., 2012, Kodet et al., 2013a). CAF mohou ovlivnit schopnost imunitního systému bránit se rozvíjejícímu nádoru. MAF dokážou potlačit aktivitu NK buněk a tím oslabit protinádorovou imunitu organismu (Balsamo et al., 2009). Inhibice pronádorového působení CAF se jeví jako potenciální cíl protinádorové terapie. Jedním z příkladů je experimentální potlačení faktoru aktivujícího fibroblasty, jež vedlo na myším modelu ke zvýšené aktivitě protinádorové imunity (Zhang and Ertl, 2016). V jedné z prací, které jsou podkladem této disertační práce, jsme se věnovali vlivům MAF na keratinocyty. Přehled hlavních mezibuněčných vztahů melanomové buňky a CAF je graficky znázorněn ve schématu 1.

Dále jsou MAF schopny stimulovat i jiné nádorové buňky než MM *in vitro* (Comito et al., 2012, Dvorankova et al., 2011, Kodet et al., 2013b, Li et al., 2009, Yin et al., 2012). MAF mohou ovlivňovat i buňky nádoru prsu (Dvorankova B. et al., 2012). Lze tedy usuzovat, že se nejedná o nádorově specifický proces. MAF stejně jako ostatní nádorově asociované fibroblasty exprimují SMA (Dvorankova et al., 2011, Krasagakis et al., 1998).



Obrázek 1: Znázornění interakcí melanomové nádorové buňky. Stimulační efekt je zobrazen plnými šipkami, inhibiční efekt je zobrazen tupými konci tvaru T. Přerušovanými šipkami je naznačena etiologie CAF a MφM2. Fibroblasty (fibroblasts), mezenchymové kmenové buňky (mesenchymal stem cells), pericyty (pericytes), nádorově asociované fibroblasty (CAF), melanomová buňka (ve středu schématu), regulační T-lymfocyty (Treg), cytotoxické t-lymfocyty (CD8), makrofágy M1 a M2 (MφM1 a MφM2), NK buňky (NK), myeloidní supresorová buňka (MDSC), keratinocyt (kerat). (Modifikováno dle (Lacina L. et al., 2018))

## **Glykobiologie**

Jedna oblast představující relativně nový pohled na nádorovou biologii je studium nádorové glykobiologie. Jedním z endogenních lektinů ovlivňujících nádorové mikroprostředí je endogenní regulační lektin – galektin-1. Fibroblasty pod vlivem galektinu-1 jsou více citlivé na ovlivnění pomocí TGF-beta (Dvorankova et al., 2011b). Podobný efekt s menším intenzitou byl pozorován i u ostatních zástupců galektinů – konkrétně 3, 4 a 7 (Kaltner and Gabius, 2012, Smetana Jr et al., 2013a).

V jedné z prací jsme se věnovali vlivu galektinu-1 na buňky ovlivněné inhibitorem syntézy polyaminů. U maligních tumorů se vyskytuje zvýšená produkce polyaminů. Polykationty včetně polyaminů se podílejí na tvorbě aktinového cytoskeletu. Specificky se účastní tvorby vazeb F-aktinových fibril (Muhlrad et al., 2011, Oriolaudin et al., 1985). Následně také ovlivňují postavení aktinu při tvorbě F-aktinového lamelipodia (Nedeva et al., 2013). Naproti tomu inhibice přirozené syntézy polyaminu pomocí blokády arginasy zlepšuje hojení ran spojené se zvýšenou incidencí myofibroblastů v granulační tkáni u myši (Kavaluka et al., 2012). To představuje další z mnoha blízkých společných charakteristik nádorů a hojící se tkáně, kde jsou spojujícím prvkem myofibroblasty. Ty se účastní na kontrakci rány, vyskytují se ve fibrotických tkáních a orgánech a fenotypově myofibroblastoidní buňky se nacházejí v nádorovém mikroprostředí. Jak u nádorů, tak u hojící se tkáně je popisován vznik myofibroblastů epitelově mezenchymovým přechodem. (Hinz, 2007, LeBleu et al., 2013).

## **Systémové změny**

Patofyziologie tumorů je spojena s pestrou řadou alterovaných biochemických a parakrinních procesů. Tyto procesy se objevují v kontextu řady buněčných populací, orgánových systémů a vnějšího prostředí organismu. Například parakrinní vliv embryonálních kmenových buněk na buňky melanomu byl pozorován v experimentech s kondiciovanými médii z těchto kmenových buněk (Kodet et al., 2013b).

Z hlediska celkových změn v organismu při onemocnění maligním nádorem jsme se věnovali studiu změn serologických markerů u pacientů s MM. Níže zmíněné markery jsou jen částečným výsekem širokého spektra serologických faktorů, které lze u pacientů s maligním onemocněním studovat, představují však signifikantní znaky vzhledem k zaměření této disertační práce.

INF- $\alpha$  představuje již dlouhodobě etablovanou molekulu, která je využívána v adjuvantní imunoterapii MM. Zvýšení hladiny INF- $\alpha$  v organismu je spojeno

s protinádorovou aktivitou imunitního systému. Oproti tomu lze usuzovat, že nízké hladiny IFN- $\alpha$  (Interferon alfa) mohou být spojeny s významným oslabením této protinádorové imunity (Ortiz and Fuchs, 2017).

Interleukin-2 a 13 představují v kontextu biologie nádorů faktory, jejichž snížená hladina je spojena s potencováním protinádorové aktivity organismu, a představují tak potenciální možnosti protinádorové terapie (Alva et al., 2016, Arend, 1991, Ma et al., 2004, Lavi et al., 2007, Buchbinder et al., 2016).

RANTES (Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) neboli protein CCL5 (Chemokin (C-C motif) ligand 5) je významný prozánětlivý chemokin, který se uplatňuje v regulaci autofagocytózy. Detailní mechanismus zapojení CCL5 v biologii malignit je stále předmětem studia, speciálně v případě melanomu (Aldinucci and Colombatti, 2014, Cambien et al., 2011). CCL5 napomáhá rekrutovat NK buňky do nádorového mikroprostředí a vysoké hladiny korelují s lepším přežitím pacientů s melanomem. Toto se jeví jako potenciální cesta zlepšení terapie melanomu (Mgrditchian et al., 2017).

CCL4 (Chemokin (C-C motif) ligand 4) je prozánětlivý faktor, jehož elevace je zdokumentována u pacientů s MM. Tento faktor je výrazně pozitivní hlavně v lymfatických uzlinách pacientů s MM (Torisu-Itakura et al., 2007).

EGF (Epidermový růstový faktor) ovlivňuje růst melanomu. Tento efekt byl výrazně pozorován u tumorů s mutacemi typu RAS (Bardeesy et al., 2005). V rámci terapie metastazujícího maligního melanomu představuje získaná resistance na BRAF-inhibitory podrobně studovaný fenomén, kde lze vidět potenciál pro další studium EGF.

V rámci naší pracovní skupiny je dlouhodobě studován potenciál pronádorové aktivity IL-6 a IL-8 (Kodet et al., 2015, Kolar et al., 2012). Změny v hladinách IL-6 a IL-8 nejsou spojeny pouze nádorovou patofyziologií, ale také s regulací a dysregulací zánětlivé odpovědi. V rámci nádorového mikroprostředí mohou být zdrojem IL-6 a IL-8 vlastní nádorové buňky, například melanomové, ale také nádorově asociované fibroblasty nebo leukocyty infiltrující tumor (Jobe et al., 2016, 2018, Kodet et al., 2015).

Sekreční potenciál těchto různých skupin buněk lze sledovat imunocytochemickou analýzou specifických populací při pokusech v tkáňových kulturách. Vztah mezi sekreční aktivitou buněk nádoru a sérovou hladinou daného mediátoru je stále předmětem bádání, i přesto však lze usuzovat, že nefyziologický nadbytek těchto mediátorů má následně ekvivaletní projekci do sérového profilu (Guida et al., 2006, Jiang et al., 2015, Karagiannis et al., 2014, Moretti et al., 2001, Yurkovetsky et al., 2007a). U IL-6 a IL-8 je zdokumentovaný významný

vliv na stimulaci metastatického šíření melanomových buněk (Jayatilaka et al., 2017, Jobe et al., 2016, 2018).

Elevace IL-6 je pozorována u pacientů s pokročilejší formou MM, kde se podílí na rozvoji chronické zánětlivé reakce spojené s katabolismem a potažmo nádorovou kachexií (Belizario et al., 2016, Miller et al., 2017, Narsale and Carson, 2014, Pettersen et al., 2017). Proto se ukazuje, že by pro pacienty s maligním melanomem mohlo být prospěšné vliv IL-6 blokovat (Uemura et al., 2016). V pokročilých fázích MM je popisován efekt IL-6 podporující invasivitu melanomových buněk a jejich růst. Oproti výše zmíněnému lze však pozorovat opačný efekt u počátečních stádií MM, kde IL-6 má inhibiční efekt na melanomové buňky (Armstrong et al., 1994, Lu and Kerbel, 1993).

IL-8, který je také známý jako chemotaktický faktor neutrofilních leukocytů nebo chemokin CXCL8, působí jako mediátor atrahující tyto buňky do místa zánětu, kde zároveň podporuje jejich fagocytovou aktivitu. Další významný efekt, který IL-8 stimuje, je novotvorba cév v místě zánětu nevyjímaje nádorové mikroprostředí. Tento význam pro nádorovou biologii je nyní studován v synergii s VEGF-alfa (Vaskulární endotelový růstový faktor alfa) (Gabellini et al., 2018). Receptory pro IL-8 představují významnou složku patofyziologie MM, receptor CXCR1 a CXCR2 (C-X-C motif chemokin receptor 1 a 2) tedy představuje potenciální nástroj pro ovlivnění rozvoje tumoru (Singh et al., 2010). Je popsáno, že hladiny IL-8 korelují se stadiem MM a změny v sérových hladinách mohou posloužit k monitoraci vývoje tumoru nebo sledování léčebné odpovědi (Sanmamed et al., 2017). Dále lze pozorovat vztah mezi sérovou hladinou IL-8 a celkovým množstvím nádorové tkáně MM (Sanmamed et al., 2014).

## **Cíle práce**

Tato disertační práce je zaměřena na studium mezibuněčných interakcí nádorů kůže melanomového a nemelanomového typu s nenádorovým prostředím.

V uvedených experimentálních pracích jsem se věnoval těmto otázkám:

- Studium původu CAF ve vztahu k primární nádorové populaci.
- Studium interakcí mezi CAF a hlavními buňkami epidermis – keratinocyty.
- Studium interakcí mezi nádorovými buňkami a fibroblasty. Studium signálních změn pozorovaných *in vitro* ve srovnání se změnami *in vivo* u pacientů s kožními nádory.
- Studium možností indukce transformace fibroblastů do CAF.



## **Experimentální metody a materiály**

V této části je uveden přehled experimentálních metod použitých při řešení plánovaných cílů. Také jsou v přehledu uvedeny zdroje biologického materiálu, který byl využit. Detailní popis metodiky je součástí publikací, které jsou přílohou této práce.

V našich pracích jsme pracovali s řadou buněčných populací různého původu. Normální lidské fibroblasty byly získány izolací ze zdravé kůže odebrané při estetických zákrocích ve spolupráci s Klinikou plastické chirurgie 3. LF UK. MAF byly připraveny z metastáz MM odebraných na Dermatovenerologické klinice 1. LF UK a VFN. CAF byly připraveny z dlaždicových karcinomů odebraných na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. LF UK a FN v Motole. Izolace buněk byla provedena dle zavedeného postupu našeho pracoviště (Kolar et al., 2012, Lacina et al., 2007c). Populace fibroblastů bohaté na myofibroblasty byly připravené z tkáně z chronických pankreatitid z Chirurgické kliniky 3. LF UK. Linie nádorových buněk z dlaždicového karcinomu hypofaryngu (FaDu) a z kolorektálního adenokarcinomu (Sw620, HT-29) a melanomu (A2058) byly získány nákupem od American Type Culture Collection. Linie buněk z MM (BLM) byla získána darem od spolupracujícího pracoviště L. van Kempena and H. van Kriekena, Ústav patologie, UMC St. Radoud Nijmegen, Nizozemí. Odběr všech tkání od dobrovolných dárců byl proveden po udělení písemného souhlasu v souladu s povolením od etických komisí příslušných zdravotnických zařízení při respektování etických doporučení Helsinské deklarace.

Hladké svalové buňky myšího původu izolované z krysí aorty byly získány od L. Bačákové z Fyziologického ústavu Akademie věd ČR.

Pokusy na myším imunodeficientním modelu (nu/nu myši) byly prováděny na 8týdenních samicích koupených od AnLab s.r.o.. Práce s myším modelem probíhala přísně v souladu s předpisy ze zákona na ochranu zvířat proti týrání a etickým standardem Mikrobiologického ústavu AV ČR. Tumory z myši byly využity dvojím způsobem. Polovina tumoru byla hluboce zmrazena a následně využita ke zhotovení histologických řezů s následným barvením. Druhá polovina byla zpracována v tkáňových kulturách k izolaci fibroblastů a nádorových buněk.

Kultivace fibroblastů byla prováděna standartními protokoly v mediu DMEM (Dulbeccem modifikované Eagleovo medium) doplněného fetálním bovinním sérem při 37°C a 5% koncentraci CO<sub>2</sub>. Nádorové linie byly kultivovány dle doporučení distributora v příslušných médiích za standartních podmínek.

Galektiny a polyaminy byly získány od H.-J. Gabiuse (Institute of Physiological Chemistry, Ludwig-Maximilians-University Munich) a J.-M. Lehna (Institut de Sciences et d'Ingénierie Supramoléculaires (ISIS) University of Strasbourg).

V analýze buněčných populací a tkáňových vzorků jsme využívali metod lektinové histochemie a imunohistochemie a imunofluorescence.

Pro sérové analýzy byla odebírána krev venepunkcí pacientům se suspektním nálezem kožního MM. Kontrolně byly odebrány vzorky venózní krve zdravým dobrovolníkům. Vše bylo provedeno až po písemném informovaném souhlasu dárců v souladu se schváleným protokolem etické komise VFN. Odebrané vzorky srážlivé krve byly centrifugovány a následně bylo sérum neprodleně zamrazeno v  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ve spolupráci s Ústavem živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově byl sérový profil proteomicky analyzován pomocí systému Luminex xMAP a zpracována pomocí softwaru R, analýzy t-testu, Kendall tau korelačního koeficientu a tSNE distribuční analýzy na témže pracovišti.

Robněž byly prováděny analýzy transkriptomu a methylace DNA na spolupracujícím pracovišti Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Z buněk připravených v tkáňových kulturách byla izolována RNA pomocí komerčního RNeasy Micro kitu, následně byla kvalitativně ověřena spektrometricky a RNA integrita byla měřena pomocí Agilent Bioanalyzeru. Microarray analýza byla provedena pomocí Illumina HumanHT-12 dle doporučeného protokolu. Získaná data byla zpracována pomocí softwaru. Pro analýzu genomové methylace byla izolována DNA Qiagen DNeasy kitem dle protokolu výrobce a následně byla kvalita ověřena spektrofotometricky. Mikročipová analýza byla provedena pomocí Illumina HumanMethylation27 dle doporučeného protokolu a následně byla data zpracována pomocí příslušného softwaru.

Analýza B-Raf mutací byla provedena po DNA extrakci z parafinových bloků s tumory a také z nádorově asociovaných fibroblastů v tkáňových kulturách po amplifikaci pomocí PCR. Následně byla DNA sekvenována a analyzována sekvenčním softwarem.

## Výsledky

Výsledky experimentální práce jsou diskutovány v následujícím přehledu publikovaných prací:

1. Dvořánková B, Smetana K Jr, Říhová B, **Kučera J**, Mateu R, Szabo P: Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice. *Histochem. Cell Biol.* 2015; 143(5):463-469 (**IF:2,164; 3 citace**)
2. **Kučera J**, Dvořánková B, Smetana K Jr, Szabo P, Kodet O : Fibroblasts isolated from the malignant melanoma influence phenotype of normal human keratinocytes. *Journal of applied biomedicine.* 2015; 13(3):195-198 (**IF:1,783; 1 citace**)
3. Kodet O, Dvořánková B, Bendlová B, Sýkorová V, Krajsová I, Štork J, **Kučera J**, Szabo P, Strnad H, Kolář M, Vlček Č, Smetana K Jr, Lacina L. Microenvironment-driven resistance to B-Raf inhibition in a melanoma patient is accompanied by broad changes of gene methylation and expression in distal fibroblasts. *International journal of molecular medicine* 2018; 41(5):2687-2703 (**IF:2,784; 3 citace**)
4. **Kučera J**, Strnadová K, Dvořánková B, Lacina L, Krajsová I, Štork J, Kovářová H, Kupcová Skalníková H, Vodička P, Motlík J, Dundr P, Smetana K Jr., Kodet O. Serum proteomic analysis of melanoma patient with immunohistochemical profiling of primary melanomas and cultured cells-Pilot study. *Oncology Reports* 2019; 42: OR-227419 (**IF: 3,041**)
5. Mifková A, Kodet O, Szabo P, **Kučera J**, Dvořánková B, André S, Koripelly G, Gabius HJ, Lehn JM, Smetana K Jr.: Synthetic polyamine BPA-C8 inhibits TGF- $\beta$ 1-mediated conversion of human dermal fibroblast to myofibroblasts and establishment of galectin-1-rich extracellular matrix in vitro. *Chembiochem: a European journal of chemical biology.* 2014;15(10):1465-70 (**IF:2,774; 2 citace**)

## Studium původu CAF ve vztahu k primární nádorové populaci.

Dvořánková B, Smetana K Jr, Říhová B, Kučera J, Mateu R, Szabo P: **Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice.** Histochem. Cell Biol 2015; 143(5):463-469

V této práci jsme se věnovali studiu původu CAF, jejichž vznik není zatím definitivně objasněn a řada prací hledá jejich zdroj v široké paletě buněk. My jsme studovali možnost vzniku CAF z epitelových buněk nádoru epitelově-mesenchymálním přechodem. Při tomto experimentu jsme využili druhově specifické protilátky proti vimentinu (klon V9) rozpoznávající vimentin lidský a nerozpoznávající vimentin myší.

V experimentu byly využity 8týdenní samice imunodeficientních nu/nu CD1 myší, které jsou charakteristické dysgenezí thymu. Z buněčných linií jsme využili lidské nádorové linie z dlaždicového karcinomu (FaDu) a kolorektálního adenokarcinomu (Sw620, HT-29). Nádorové linie byly kultivovány *in vitro* dle standartních podmínek a následně byly aplikovány subkutánně. Jednotlivé skupiny myší byly usmrceny v intervalu 13, 17, 19, 21 a 24 dní po aplikaci xenoštěpu. Následně byly odebrané tumory zpracovány pro imunohistochemickou analýzu a pro přípravu tkáňových kultur.

Všechny typy nádorových buněk v myších utvořily dobře organizované nádorové stroma. Stroma tumorů bylo bohaté na fibronektin a byly přítomné CAF pozitivní na SMA. Verifikace byla provedena pomocí detekce endotelového markeru CD31 a detekce desmin-pozitivní hladké svaloviny, což jsou charakteristické znaky krevních cév a byly využity pro odlišení CAF od cév. Pro stanovení původu CAF jsme využili detekci lidského typu vimentinu, který byl v okolí tumorů absentující.

Dokázali jsme, že nádorové buňky implantované do myšího modelu nevytvořily CAF, a tedy že stroma tumoru bylo tvořeno z buněk myšího původu. Také jsme tímto prokázali, že buňky lidských nádorů jsou schopny na myším modelu stimulovat tvorbu nádorového stromatu. Na tomto pozorování tedy lze potvrdit mezidruhovou univerzálnost mezibuněčných interakcí v rámci nádorů a stromatu.

## **Studium interakcí mezi CAF a hlavními buňkami epidermis – keratinocyty.**

**Kučera J, Dvořánková B, Smetana K Jr, Szabo P, Kodet O: Fibroblasts isolated from the malignant melanoma influence phenotype of normal human keratinocytes. J.Appl Biomed. 2015; 13(3):195-198**

V této studii jsme se věnovali studiu interakcí mezi MAF a kokultivovanými keratinocyty.

Dermální fibroblasty a normální keratinocyty byly získány od zdravé dárkyně podstupující estetickou operaci. MAF byly izolované z kožní metastázy od dárkyně s generalizovaným MM. Byly provedeny přímé kokultury keratinocytů s MAF a kontrolně kokultury keratinocytů s normálními dermálními fibroblasty. Keratinocyty v obou případech vytvářely kolonie. V případě kokultury s MAF byly keratinocyty výrazně K14 (keratin 14) pozitivní proti kokultuře s normálními fibroblasty, kde byla tato pozitivita pouze v oblasti periferie kolonií. Toto zjištění je v souladu s ostatními experimenty naší pracovní skupiny. (Kodet et al., 2015).

Studovali jsme i expresi vimentinu, který je normálně v lidských keratinocytech přítomen minoritně. Keratinocyty pod vlivem MAF obsahovaly vimentin spolu s vysokomolekulárními keratiny s výraznou akcentací v oblasti okraje kolonií. Proti tomu keratinocyty pod vlivem normálních fibroblastů tyto znaky nevykazovaly. Prokázali jsme tedy, že MAF dokážou ovlivnit vlastnosti keratinocytů. Vimentin-pozitivní keratinocyty měly morfologicky prodloužený tvar s předozadní polarizací, který lze typicky najít u migrujících buněk. Signál pro vimentin byl tedy výrazně akcentován v oblasti vedoucího okraje kolonie epitelových buněk. Tento jev byl v pokusech našeho pracoviště již opakovaně pozorován při kokultivaci CAF získaných z dlaždicového karcinomu a s buňkami z benigního fibrózního histiocytomu spolu s normálními keratinocyty (Lacina et al., 2007). Ukazuje se, že vimentin je významný pro normální keratinocyty během jejich aktivního klonálního růstu (Castro-Munozledo et al., 2015). A lze tedy říci, že MAF mohou svou interakcí s normálními keratinocyty ovlivnit biologické vlastnosti MM.

**Studium interakcí mezi nádorovými buňkami a fibroblasty. Studium signálních změn pozorovaných *in vitro* ve srovnání se změnami *in vivo* u pacientů s kožními nádory. Imunocyto/histochemická a genomická analýza**

Kodet O, Dvořánková B, Bendlová B, Sýkorová V, Krajsová I, Štork J, Kučera J, Szabo P, Strnad H, Kolář M, Vlček Č, Smetana K Jr, Lacina L. **Microenvironment-driven resistance to B-Raf inhibition in a melanoma patient is accompanied by broad changes of gene methylation and expression in distal fibroblasts.** Int J Mol Med 2018; 41(5):2687-2703

V této studii jsme se věnovali expresním změnám u CAF izolovaných od pacientky s akrolentiginózním MM vykazujícím B-Raf V600E mutaci.

Studované buňky byly MAF z kožní metastázy MM, která byla odebrána pro stanovení B-Raf mutace. Dále od stejné dárkyně byly izolovány autologní kontrolní normální fibroblasty (ACF), které byly odebrány ze zdravé nádorově neinfiltrované kůže během 3. měsíce trvající terapie B-Raf inhibitory v období, kdy pacientka byla bez známek další progresu choroby. Dále byly jako kontrolní dermální fibroblasty (CDF) použity normální fibroblasty z obdobné anatomické lokalizace 3 zdravých žen, které byly získány během estetických zákroků. Všechny typy fibroblastů byly kultivovány dle standardních podmínek, kontrolní fibroblasty byly kultivovány v mediu s příměsí TGF-beta 1 pro indukci SMA. Ze subkonfluentních kultur byly buňky využity na imunocytochemickou analýzu a na analýzu nukleových kyselin.

V tkáňových kulturách byla prokázána pozitivita SMA u autologních MAF. Kontrolní fibroblasty jiných dárců neexprimovaly SMA, ale po stimulaci TGF-beta 1 jsme pozorovali obdobný fenotyp, jako jsou MAF. TGF-beta 1 tedy prokazatelně facilitoval transformaci fibroblastů v myofibroblasty. Melanomové buňky při imunohistochemické analýze vykazovaly pozitivitu TGF-beta 1. Paradoxně ACF vysoce exprimovaly SMA!

MAF neměly přítomnou B-Raf mutaci, která byla u buněk melanomu, a tedy lze předpokládat, že nevznikly epitelově mesenchymálním přechodem. Srovnání expresního profilu MAF, ACF a CDF prokázalo u ACF vůči CDF vyšší aktivaci genů zodpovědných za aktivaci fibroblastů – specificky lokusy pro TGF-beta nebo IL-6. Tento aktivovaný stav u fibroblastů velmi vzdálených od původní nádorové masy podporuje pohled na MM jako na systémovou chorobu. Při DNA analýze jsme prokázali zvýšenou transkripční aktivitu v methylaci pro oblast SMA u ACF. Zjištěné rozdíly mezi ACF a CDF ukazují, že přítomnost

nádoru je spojena s celkovými systémovými změnami organismu a lze usuzovat, že některé alterace by mohly být detekovatelné například analýzou serologického profilu pacientů.

### **Proteomická analýza sér, imunohistochemická a imunocytochemická analýza**

**Kučera J, Strnadová K, Dvořánková B, Lacina L, Krajsová I, Štork J, Kovářová H, Kupcová Skalníková H, Vodička P, Motlík J, Dundr P, Smetana K Jr., Kodet O. Serum proteomic analysis of melanoma patients with immunohistochemical profiling of primary melanomas and cultured cells: Pilot study. Oncol Rep 2019; 42: OR-227419**

Jak již bylo zmíněno v ostatních částech disertační práce, nádorové onemocnění je komplexní. Pozorujeme změny v oblasti vlastního nádoru, v nádorovém stromatu – mikroprostředí tumoru – a také ostatních oblastech organismu postiženého jedince. V této studii jsme se věnovali analýze serologického profilu pacientů s MM. Jeden ze znaků nádorů je indukce zánětu s postupným přechodem do chronické zánětlivé reakce, na které se podílí celá řada bioaktivních molekul.

Ve studii jsme odebírali vzorky sér dobrovolných dárců. Studovali jsme 12 pacientů s MM, kdy jsme odebírali séra před chirurgickou excizí tumoru a následně 1 a 3 měsíce po excizi. Jako kontroly jsme použili séra 5 zdravých dobrovolníků. Následně jsme séra analyzovali pomocí Luminex xMAP na hladiny 31 cytokinů. Resekáty tumorů jsme studovali imunohistochemicky.

U pacientů s melanomem jsme prokázali rozdílné hladiny v sérových proteinech IL-1RA (Interleukin 1 receptor antagonist), IL-2, IL-13, RANTES a G-CSF (Faktor stimulující kolonie granulocytů) oproti zdravým kontrolám. Prokázali jsme také korelaci mezi prognostickým markerem MM (Breslow hodnotou) a sérovými hladinami IL-6, IL-8, IL-13 a VEGF-alfa. Profil IL-1RA, IL-13, IFN $\alpha$  a RANTES koreloval s klinickým stadiem melanomu v době diagnózy tumoru. Imunohistochemickou analýzou tumorů studovaných pacientů jsme prokázali v MM pozitivitu HGF (Hepatocytární růstový faktor), IL-6 a receptorů IL6-R a VEGF-R1 (Receptor 1 pro vaskulární endotelový růstový faktor). V tkáňových kulturách jsme u normálních melanocytů pozorovali absenci signálu pro IL-6, IL-8, CXCR1/2, VEGF a VEGF-R1/R2. Ve srovnání normálních fibroblastů a melanom-asociovaných fibroblastů jsme zjistili u MAF zvýšenou pozitivitu pro IL-6, IL-8, CXCR1 a CXCR2.

Naše zjištění prokázaly vliv nádoru na široké změny v serologickém profilu pacientů, a tedy systémový charakter nádorového onemocnění. V různé míře byly zjištěny změny v sérových hladinách růstových faktorů (HGF, VEGF, G-CSF), cytokinů (IL-6, IL-2, IL-1RA, IFN- $\alpha$ ) a chemokinů (IL-8, RANTES), které mohou představovat potenciální cestu ke zjemnění diagnostiky a sledování průběhu onemocnění. Vzhledem k obecně známé, a i námi pozorované interindividuální variabilitě biomarkerů je jedna z možných cest aplikace serologické analýzy jako kombinace více biomarkerů.



## **Studium možností ovlivnění transformace fibroblastů v CAF.**

Mifková A, Kodet O, Szabo P, **Kučera J**, Dvořánková B, André S, Koripelly G, Gabius H-J, Lehn JM, Smetana K Jr.: **Synthetic polyamine BPA-C8 inhibits TGF- $\beta$ 1-mediated conversion of human dermal fibroblast to myofibroblasts and establishment of galectin-1-rich extracellular matrix in vitro.** Chembiochem. 2014;15(10):1465-1470

Ovlivnění nádorového mikroprostředí představuje jednu z možných cest zlepšení terapie tumorů. Jak již bylo zmíněno, důležitými buňkami nádorového prostředí jsou CAF. Pro myofibroblasty i CAF je typická přítomnost SMA. Aktinový cytoskelet je citlivý na vliv polyaminů, které mohou ovlivnit jeho konfiguraci. V této práci jsme studovali vliv syntetického polyaminu BPA-C8 na přeměnu lidských kožních fibroblastů v myofibroblasty. Ovlivnění nádorového stromatu představuje perspektivní směr vývoje léčby tumorů, kde mohou polykationty hrát významnou roli.

Přeměnu kožních fibroblastů v myofibroblasty jsme stimulovali vlivem jednak samostatného TGF-beta 1 a poté také TGF-beta 1 s galektinem-1. Kontrolní populace buněk představovaly CAF izolované z dlaždicového karcinomu hlavy a krku, myofibroblasty z chronické pankreatitidy a hladké svalové buňky z krysí aorty. Prokázali jsme inhibiční vliv BPA-C8 na aktivaci fibroblastů na myofibroblasty. Buňky již dříve produkující SMA ovlivněny nebyly. Zároveň jsme pozorovali vliv BPA-C8 na produkci extracelulární matrix, kde byla snížena pozitivita tenascinů v okolí aktivovaných fibroblastů.

Tato studie přinesla zjištění, že pokud jsou fibroblasty exponovány efektu TGF-beta 1 spolu s polyaminem BPA-C8, tak je blokována přeměna na myofibroblasty. Tento efekt byl spojen se snížením viability fibroblastů v závislosti na dávce polyaminu. Nepozorovali jsme vliv BPA-C8 na proliferační aktivitu sledovanou markerem Ki67 (Antigen Ki-67). Polykation BPA-C8 ovlivňuje primární anionické proteiny jako například aktin, ale může ovlivňovat i další složky buněčného systému, což může vysvětlovat sníženou viabilitu fibroblastů a změny v tvorbě extracelulární matrix.

## **Diskuse**

Pro splnění vytyčených cílů této disertační práce jsme se věnovali několika okruhům, které přinesly řadu dílčích zjištění.

V první řadě jsme se věnovali studiu původu CAF. Stroma tumorů je tvořeno početnými heterogenními populacemi fibroblastů (Sugimoto H. et al., 2006), jejichž etiologie je stále nejasná. Pro studii jsme volili metodu implantace nádorových buněk do myšího modelu. První poznatkem byl fakt, že po implantaci se okolo tumoru vytvořilo mikroprostředí obsahující CAF, a tedy že lidské nádorové buňky jsou schopny indukovat pro tumor vhodné mikroprostředí u jiného živočišného druhu. Významným zjištěním je, že CAF byly původem z hostitelského organismu, a tedy že nádorové buňky nevytvořily CAF vlastní buněčnou transformací, ale interakcí s mikroprostředím. Lze odhadovat, že interakce mezi mezenchymem a nádorovými buňkami může být do určité míry univerzální nejen mezi člověkem a myší, ale i napříč širším spektrem živočišných druhů. Významnou složkou patofyziologie malignit je činnost imunitního systému (Kundu and Surh, 2008), tudíž je při studiu na myším modelu (nu/nu) nezbytné zmínit imunodeficienci pokusných zvířat. Vzhledem k deficitu T-lymfocytární imunity se jedná o stav se změněnou imunitní odpovědí. Vliv imunitního systému na fibroblasty je široký a například vznik fibroblastů, které jsou velmi podobné CAF, se objevuje v terénu chronického zánětu vyúsťujícího ve fibrózu (Guarino et al., 2009). Tato paralela s tumory tedy představuje potenciální prostor pro další studium role imunitního systému na formování CAF.

Další významnou složkou kůže, která interaguje s kožními tumory, jsou keratinocyty. Naše experimentální práce se věnovala vlivu nádorově asociovaných fibroblastů z melanomu na keratinocyty. U keratinocytů byla pod vlivem melanomových buněk pozorována výrazná exprese keratinu 14, která je jinak typická pro bazální vrstvy epidermis. Dále byla tato exprese zjištěna na krajích kolonií keratinocytů stimulovaných IL-8, CXCL1, VEGF-A a FGF-2. Melanomové buňky rovněž stimulovaly keratinocyty ke zvýšené pozitivitě vimentinu. (Kodet et al., 2015). Zvýšená exprese vimentinu byla dále pozorována na okraji kolonií keratinocytů pod vlivem CAF z dlaždicobuněčného karcinomu (Kideryova et al., 2009).

V naší studii jsme zjistili, že keratinocyty kokultivované pod vlivem MAF mají oproti kokultivaci s normálními dermálními fibroblasty zvýšenou expresi keratinu 14. Zároveň byla přítomná zvýšená pozitivita vimentinu v okraji kolonií, kde byly pozorovány morfologicky prodloužené buňky, které se typicky vyskytují u migrujících buněk. Bylo tedy zjištěno, že MAF

jsou schopné ovlivňovat keratinocyty podobným způsobem jako samotné melanomové buňky (Haass et al., 2010b).

Samotná pozitivita vimentinu byla nejvyšší u expandujícího okraje keratinocytů. Pozitivita vimentinu se dává do souvislosti s extenzivním růstem a dělením keratinocytů (Castro-Munozledo et al., 2015). Vzhledem k prokázané schopnosti keratinocytů ovlivnit migraci melanomových buněk (Keswell et al., 2012) mohou naše zjištění přispět k pochopení patofyziologie maligního melanomu. Další studium interakce melanomových buněk, MAF, keratinocytů a složek imunitního systému je jednou z cest ke zlepšení prognózy pacientů s MM.

Lidskou kůži zdravých jedinců tvoří mimo jiných buněčných populací i heterogenní populace fibroblastů (Driskell and Watt, 2015). Jejím příbuzné ekvivalenty v nádorovém stromatu jsou myofibroblasty typu CAF a MAF. Melanomové buňky jsou schopné atrahovat a transformovat normální buňky v MAF pomocí TGF-beta (Tomasek et al., 2002). TGF-beta má významnou roli v patologii řady tumorů, kde je ovšem pozorována variabilita v efektu této signální molekuly v rozsahu pro a protinádorové aktivity (Drabsch and ten Dijke, 2012).

V naší práci jsme srovnávali tři kategorie fibroblastů. MAF z okolí BRAF- pozitivního nodulárního MM, fibroblasty též pacientky odebrané ze vzdálené klinicky nepatologické kůže (ACF) a kontrolní fibroblasty obdobné lokality od dobrovolných dárců (DCF). Zjistili jsme, že MAF neměly stejnou mutaci jako nádorové buňky. Absence BRAF mutace ukazuje, že fibroblasty pocházely z okolní dermis, a ne z epitel-mesenchymálního přechodu. Při srovnání expresního profilu MAF, ACF a DCF se ukázal významný rozdíl v aktivitě genů pro mediátory IL-6 a TGF-beta. Změny ve vzdálených fibroblastech v jinak normální kůži u nemocných s melanomem ukazují, že melanom má systémové účinky, což je v souladu s ostatními experimentálními pozorováními (Krasagakis et al., 1994).

Námi studovaná pacientka byla při odběru ACF pod vlivem terapie BRAF-inhibitory a ve studiích in vitro se ukazuje, že BRAF inhibitory stimulují melanomové buňky, které následně reagují vylučováním řady parakrinních faktorů (Whipple and Brinckerhoff, 2014). Ovlivnění nádorové masy terapií může přes parakrinní aktivitu nádoru vyvolat změny ve vzdálených oblastech organismu, jako jsou například ACF. Nicméně v našem experimentu byly ACF kultivovány a skladovány mimo efekt BRAF-inhibitoru a melanomových buněk více jak dva měsíce. Tato perzistující charakteristika může být dána změnou genové methylace. U ACF jsme zjistili zvýšenou expresi SMA a zvýšenou transkripci příslušného genu ACTA2 spolu se zvýšenou methylací ACTA2 jak u ACF, tak u MAF, což ukazuje na možnou epigenetickou alteraci ACF.

Absence BRAF mutace u MAF spolu s daty ukazujícími na schopnost MAF ovlivňovat chování melanomu představuje potenciální cestu snížené efektivity terapie BRAF inhibitory. Námi pozorované rozdíly mezi ACF a CDF na úrovni DNA methylace a transkriptomu ukazují na potenciálně aktivované mikroprostředí v organismu u pacientů s maligním melanomem, které může následně ovlivnit schopnost melanomu metastazovat (Li et al., 2009).

Naše pozorování vychází z analýzy jednotlivého klinického případu, ale vzhledem k obdobným pozorováním jiných autorů (Llopiz et al., 2009, Morris et al., 2014) považujeme data za perspektivní k další studii systémového působení maligního melanomu a jeho mikroprostředí.

Vzhledem k systémovému působení MM lze očekávat rozdíly mezi nemocným a zdravým organismem. V další práci jsme se věnovali hledání změn na úrovni serologických markerů. U pacientů s klinicky přítomným MM jsme zjistili signifikantní serologické změny: snížené hladiny IL-2, IL-13, RANTES a G-CSF a zvýšení IL-1RA. Dále jsme pozorovali korelaci mezi klinickým stadiem melanomu a markery RANTES, IFN-alfa, IL13 a IL-1RA. Prognosticky významná hodnota Breslow korelovala se sérovými hladinami IL-6, IL-8, IL-13 a VEGF. Význam IL-6 a IL-8 pro nádorovou biologii byl popsán již v několika pracích naší pracovní skupiny (Kodet et al., 2015, Kolar et al., 2012) a obecně lze říci, že je u těchto markerů pozorován jejich efekt na podporu progresu a metastazování tumorů (Jayatilaka et al., 2017). Z naší práce zmíněné v předchozích odstavcích rovněž vyplývá, že alterace IL-6 se týká i nádorového mikroprostředí, přesněji CAF.

Efekt IL-6 může být stimulační na progresi a invazivitu melanomu v pokročilých stádiích onemocnění, na druhou stranu v raných stádiích onemocnění je popisován efekt inhibiční (Armstrong et al., 1994, Lu and Kerbel, 1993). U nemocných v pokročilém stádiu MM se inhibice IL-6 ukazuje jako cesta zlepšení prognózy a kvality života nemocných (Uemura et al., 2016). V experimentech na zvířecím modelu byl pozorován vliv IL-8 na podporu vaskularizace nádorového mikroprostředí (Gabellini et al., 2018) a IL-8 obecně představuje významný chemokin pro progresi a metastazování MM (Singh et al., 2010). Publikované výsledky podobné naší studii se týkaly korelace hladin IL-8 s velikostí řady tumorů, včetně MM (Sanmamed et al., 2014). Ukazuje se, že hladiny IL-8 mohou hrát roli v monitoraci závažnosti MM včetně možnosti monitorace efektivity terapie (Sanmamed et al., 2017). Oproti poměrně čerstvým datům o vlivu IL-8 na vaskulogenezi je obdobný efekt VEGF dobře známý a je předmětem vývoje protinádorové terapie (Jayson et al., 2016). Elevace VEGF v séru je spojena s oslabením protinádorové imunity a s progresí tumorů (Ohm et al., 2003) včetně MM

(Nevala et al., 2009). Následně jsme imunohistochemicky studovali i IL-6, IL-8 a VEGF a jejich receptory na samotných tumorech a dále na tkáňových kulturách melanomových buněk a CAF, kde jsme zjistili ekvivalentní změny jako u serologických dat. Pozorovali jsme však značnou variabilitu jednotlivých vzorků.

V adjuvantní terapii MM se uplatňuje imunomodulační léčba rekombinantním INF-alfa, která má za cíl stimulovat protinádorovou imunitu organismu (Ortiz and Fuchs, 2017). Pokles hladin INF-alfa u námi testovaných pacientů dokumentuje opodstatnění této terapie. Obdobně námi pozorovaný pokles hladin IL-2 souvisí s potenciálními terapeutickými možnostmi tohoto interleukinu (Mizui, 2018). Další možný cíl protinádorové terapie představuje IL-13, u kterého jsme také zjistili nižší serologické hladiny (Ma et al., 2004).

Naše zjištění ukazují na změny řady serologických parametrů u nemocných s MM, a to primárně v oblasti protinádorové imunity. Obecně jsme pozorovali variabilitu v hladinách sérových markerů mezi jednotlivými pacienty. Pozorované hladiny IL-6 a IL-8 nepoklesly ihned po chirurgické resekci tumoru, což by mohlo naznačovat celkové prozánětlivé prostředí u sledovaných pacientů. Vzhledem k prokazatelným změnám, ale současně přítomné interindividuální variabilitě, jsou nutné další rozsáhlejší studie pro robustnější statistická data. Zároveň se ukazuje, že pravděpodobně bude v budoucnu nutné u pacientů s MM sledovat více markerů současně nebo různé markery v závislosti na stádiu onemocnění.

V poslední části disertační práce jsme se věnovali interakcím v kožních nádorech z hlediska možného intervenčního přístupu. Jak již bylo opakovaně zmíněno, CAF představují významnou komponentu biologie tumorů. Transformace fibroblastů v CAF je indukována vlivem TGF-beta 1 (Busse and Keilholz, 2011). Provedli jsme sérii experimentů, kde jsme sledovali možnost omezit tuto interakci pomocí experimentálního syntetického polyaminu BPA-C8, který byl syntetizován na spolupracujícím pracovišti.

Fibroblasty pod vlivem TGF-beta 1 samostatně nebo v kombinaci s galectin-1 vykazovaly zvýšení proliferační aktivity. Fibroblasty po této stimulaci přecházely do myofibroblastového fenotypu charakteru CAF, což jsme detekovali pozitivitou SMA. Hlavním zjištěním bylo, že polyamin BPA-C8 signifikantně blokoval přechod do myofibroblastů, a to v nízké i vysoké koncentraci. Po aplikaci TGF-beta 1 jsme také pozorovali zvýšenou tvorbu extracelulární matrix detekovanou pomocí značení tenascinem. I zde jsme zaznamenali omezení tohoto efektu po podání testovaného polyaminu. Při vyšších koncentracích polyaminu jsme pozorovali sníženou viabilitu buněk, kdy tento efekt byl výraznější při současné aplikaci TGF-beta 1. Značení Ki-67 zároveň ukázalo, že proliferační aktivita nebyla výrazně změněna.

Vliv polyaminu na již formované SMA pozitivní buňky jsme studovali na hladkých svalových buňkách, CAF a myofibroblastech. Polyamin BPA-C8 neměl na tyto buňky signifikantní vliv v žádné koncentraci, a tak jsme pozorovali konstantní pozitivitu SMA a ani jsme nedetekovali výrazné změny v extracelulární matrix.

Vliv polyaminů na buňky je komplexní (Shikina et al., 2009) a námi zjištěné ovlivnění tvorby SMA je zároveň spojeno s vlivem i na další buněčné procesy, díky nimž jsme pozorovali redukci mezibuněčné hmoty a snížení přežívání ovlivněných buněk. Blokování transformačního vlivu TGF-beta 1 na fibroblasty bylo nicméně signifikantní.

Primárním cílem výzkumu terapie tumorů jsou tradičně vlastní nádorové buňky. Nádorové mikroprostředí a interakce mezi buněčnými populacemi představují další významnou komponentu. Většina úmrtí na malignity je v důsledku metastazujícího onemocnění (Sleeman and Steeg, 2010), což je ze své podstaty složitý systém s více komponentami, než jen samotnými nádorovými buňkami. Studium těchto systémů je komplexní a je spojeno s řadou úskalí, ale výzkum mezibuněčných interakcí představuje perspektivní cestu ke zlepšení prognózy nádorových onemocnění.

## **Splnění cílů disertační práce**

Experimentální práce se v rámci studia mezibuněčných interakcí nádorů kůže věnovala 4 dílčím cílům.

- 1) **Cílem bylo studium původu nádorově asociovaných fibroblastů ve vztahu k primární nádorové populaci.** Na myším modelu jsme prokázali, že po implantaci lidského tumoru vznikly nádorově asociované fibroblasty, které byly myšího původu, neboli nádorové buňky se netransformovaly na nádorově asociované fibroblasty. Také experiment ukázal mezidruhovou univerzálnost patologie tumorů, kde vznik nádorového stromatu u myši indukovaly lidské nádorové buňky. Cíle tohoto okruhu považujeme za **splněné**.
- 2) **Cílem bylo studovat vztah mezi nádorově asociovanými fibroblasty a keratinocyty.** Prokázali jsme, že nádorově asociované fibroblasty z melanomu dokáží ovlivnit keratinocyty. Keratinocyty pod vlivem nádorově asociovaných fibroblastů získaly na okraji kolonie signifikantní pozitivitu pro vimentin, tedy znaku buněk migrujících mezenchymovým mechanismem a rovněž i epitelově mezenchymového přechodu. Cíle tohoto okruhu považujeme za **splněné**.
- 3) **Cílem bylo studium interakcí mezi nádorovými buňkami a zdravými fibroblasty.** Prokázali jsme, že expresní profil fibroblastů ze zdravé kůže u pacientů postižených melanomem se liší od kontrolních fibroblastů v expresním profilu. Dále jsme prokázali, že melanom asociované fibroblasty nenesou BRAF mutaci melanomových buněk, a tedy nevznikly přechodem z melanomu. Změny v distálních fibroblastech ukazují systémový efekt melanomu. Dále jsme studovali serologický profil pacientů s melanomem, kde jsme prokázali alteraci řady sérových markerů u nemocných vůči kontrolním vzorkům zdravých dobrovolníků. Prokázali jsme tedy několik systémových změn při onemocnění melanomem. Cíle tohoto okruhu považujeme za **splněné**.
- 4) **Cílem bylo studium ovlivnění transformace fibroblastů v nádorově asociované fibroblasty.** Prokázali jsme, že lze blokovat transformační efekt TGF-beta 1 na fibroblasty pomocí polyaminů, specificky polyaminem BPA-C8. Prokázali jsme také vliv tohoto polyaminu na extracelulární matrix a viabilitu fibroblastů. Cíle tohoto okruhu považujeme za **splněné**.

## **Seznam literatury**

- Aldinucci D. & Colombatti A. The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. *Mediators Inflamm.* 2014, 2014, 292376.
- Allen M. & Jones J. L. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J. Pathol.* 2011, 223,2, 162-176.
- Alter M., Hillen U., Leiter U., Sachse M. & Gutzmer R. Current diagnosis and treatment of basal cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015, 13,9, 863-74; quiz 875.
- Alva A., Daniels G. A., Wong M. K., Kaufman H. L., Morse M. A., Mcdermott D. F. et al. Contemporary experience with high-dose interleukin-2 therapy and impact on survival in patients with metastatic melanoma and metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2016, 65,12, 1533-1544.
- Amend S. R. & Pienta K. J. Ecology meets cancer biology: The cancer swamp promotes the lethal cancer phenotype. *Oncotarget.* 2015, 6,12, 9669-9678.
- American Academy of Dermatology Ad Hoc Task Force for The A. O. M. et al. Early detection of melanoma: reviewing the ABCDEs. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2015, 72,4, 717-23.
- Archambault M., Yaar M. & Gilchrest B. A. KERATINOCYTES AND FIBROBLASTS IN A HUMAN SKIN EQUIVALENT MODEL ENHANCE MELANOCYTE SURVIVAL AND MELANIN SYNTHESIS AFTER ULTRAVIOLET-IRRADIATION. *J. Invest. Dermatol.* 1995, 104,5, 859-867.
- Arend W. P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin. Invest.* 1991, 88,5, 1445-51.
- Armstrong C. A., Murray N., Kennedy M., Koppula S. V., Tara D. & Ansel J. C. Melanoma-derived interleukin 6 inhibits in vivo melanoma growth. *J. Invest. Dermatol.* 1994, 102,3, 278-84.
- Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front. Oncol.* 2014, 4, 62.
- Balch C. M., Gershenwald J. E., Soong S. J., Thompson J. F., Atkins M. B., Byrd D. R. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* 2009, 27,36, 6199-206.
- Balsamo M., Scordamaglia F., Pietra G., Manzini C., Cantoni C., Boitano M., Queirolo P. et al. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *PNAS.* 2009, 106,49, 20847-20852.
- Barcellos-Hoff M. H. & Ravani S. A. Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer Res.* 2000, 60,5, 1254-60.
- Bardeesy N., Kim M., Xu J., Kim R. S., Shen Q., Bosenberg M. et al. Role of epidermal growth factor receptor signaling in RAS-driven melanoma. *Mol. Cell Biol.* 2005, 25,10, 4176-88.
- Belizario J. E., Fontes-Oliveira C. C., Borges J. P., Kashiabara J. A. & Vannier E. Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6. *Springerplus.* 2016, 5, 619.



- Bollag G., Hirth P., Tsai J., Zhang J., Ibrahim P. N., Cho H., et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*. 2010, 467,7315, 596-9.
- Borovski T., Melo F. D. E., Vermeulen L. & Medema J. P. Cancer Stem Cell Niche: The Place to Be. *Cancer Res*. 2011, 71,3, 634-639.
- Brantsch K. D., Meisner C., Schonfisch B., Trilling B., Wehner-Caroli J., Rocken M. & Breuninger H. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol*. 2008, 9,8, 713-20.
- Brenmoehl J., Miller S. N., Hofmann C., Vogl D., Falk W., Scholmerich J. & Rogler G. Transforming growth factor-beta 1 induces intestinal myofibroblast differentiation and modulates their migration. *World J. Gastroenterol*. 2009, 15,12, 1431-1442.
- Brenner M., Degitz K., Besch R. & Berking C. Differential expression of melanoma-associated growth factors in keratinocytes and fibroblasts by ultraviolet A and ultraviolet B radiation. *Br. J. Dermatol*. 2005, 153,4, 733-739.
- Brougham N. D., Dennett E. R., Cameron R. & Tan S. T. The incidence of metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma and the impact of its risk factors. *J. Surg. Oncol*. 2012, 106,7, 811-5.
- Buchbinder E. I., Gunturi A., Perritt J., Dutcher J., Aung S., Kaufman H. L. et al. A retrospective analysis of High-Dose Interleukin-2 (HD IL-2) following Ipilimumab in metastatic melanoma. *J. Immunother. Cancer*. 2016, 4, 52.
- Busse A. & Keilholz U. Role of TGF-beta in melanoma. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2011, 12,12, 2165-75.
- Cambien B., Richard-Fiardo P., Karimjee B. F., Martini V., Ferrua B., Pitard B., Schmid-Antomarchi H. & Schmid-Alliana A. CCL5 neutralization restricts cancer growth and potentiates the targeting of PDGFRbeta in colorectal carcinoma. *PLoS One*. 2011, 6,12, e28842.
- Cancer Genome Atlas N. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015, 161,7, 1681-96.
- Cascinelli N. Margin of resection in the management of primary melanoma. *Semin. Surg. Oncol*. 1998, 14,4, 272-5.
- Castro-Munozledo F., Velez-Delvalle C., Marsch-Moreno M., Hernandez-Quintero M. & Kuri-Harcuch W. Vimentin is necessary for colony growth of human diploid keratinocytes. *Histochem. Cell Biol*. 2015, 143,1, 45-57.
- Chang C. Y., Pasolli H. A., Giannopoulou E. G., Guasch G., Gronostajski R. M., Elemento O. & Fuchs E. NFIB is a governor of epithelial-melanocyte stem cell behaviour in a shared niche. *Nature*. 2013, 495,7439, 98-102.
- Chapman P. B., Hauschild A., Robert C., Haanen J. B., Ascierto P., Larkin J. et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med*. 2011, 364,26, 2507-16.
- Chen L. L., Jaimes N., Barker C. A., Busam K. J. & Marghoob A. A. Desmoplastic melanoma: a review. *J. Am. Acad. Dermatol*. 2013, 68,5, 825-33.
- Chung H., Suh E. K., Han I. O. & Oh E. S. Keratinocyte-derived Laminin-332 Promotes Adhesion and Migration in Melanocytes and Melanoma. *J. Biol. Chem.*. 2011, 286,15, 13438-13447.

- Clark W. H., Jr. & Mihm M. C., Jr. Lentigo maligna and lentigo-maligna melanoma. *Am. J. Pathol.* 1969, 55,1, 39-67.
- Cochran A. J., Balda B. R., Starz H., Bachter D., Krag D. N., Cruse C. W., Pijpers R. & Morton D. L. The Augsburg Consensus. Techniques of lymphatic mapping, sentinel lymphadenectomy, and completion lymphadenectomy in cutaneous malignancies. *Cancer.* 2000, 89,2, 236-41.
- Colegio O. R., Chu N. Q., Szabo A. L., Chu T., Rhebergen A. M., Jairam V. et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature.* 2014, 513,7519, 559-63.
- Coleman W. P., 3rd, Loria P. R., Reed R. J. & Krementz E. T. Acral lentiginous melanoma. *Arch. Dermatol.* 1980, 116,7, 773-6.
- Comito G., Giannoni E., Di Gennaro P., Segura C. P., Gerlini G. & Chiarugi P. Stromal fibroblasts synergize with hypoxic oxidative stress to enhance melanoma aggressiveness. *Cancer Letters.* 2012, 324,1, 31-41.
- Curtin J. A., Fridlyand J., Kageshita T., Patel H. N., Busam K. J., Kutzner H. et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *New Engl. J. Med.* 2005, 353,20, 2135-47.
- D'orazio J., Jarrett S., Amaro-Ortiz A. & Scott T. UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14,6, 12222-12248.
- Davies H., Bignell G. R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002, 417,6892, 949-54.
- De Wever O., Demetter P., Mareel M. & Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int. J. Cancer.* 2008, 123,10, 2229-2238.
- Demierre M. F., Chung C., Miller D. R. & Geller A. C. Early detection of thick melanomas in the United States: beware of the nodular subtype. *Arch. Dermatol.* 2005, 141,6, 745-50.
- Di Stefani A. & Chimenti S. Basal cell carcinoma: clinical and pathological features. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 2015, 150,4, 385-91.
- Dolan D. E. & Gupta S. PD-1 Pathway Inhibitors: Changing the Landscape of Cancer Immunotherapy. *Cancer Control.* 2014, 21,3, 231-237.
- Drabsch Y. & Ten Dijke P. TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2012, 31,3-4, 553-568.
- Driskell R. R. & Watt F. M. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol.* 2015, 25,2, 92-99.
- Duffy M. M., Ritter T., Ceredig R. & Griffin M. D. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res. Ther.* 2011, 2.
- Dummer R., Goldinger S. M., Paulitschke V. & Levesque M. P. Curing advanced melanoma by 2025. *Curr. Opin. Oncol.* 2015, 27,2, 125-7.
- Dvorak H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* 1986, 315,26, 1650-9.
- Dvorankova B., Szabo P., Lacina L., Gal P., Uhrova J., Zima T., Kaltner H., Andre S., Gabius H.-J., Sykova E. & Smetana K., Jr. Human Galectins Induce Conversion of Dermal Fibroblasts into Myofibroblasts and Production of Extracellular Matrix: Potential

- Application in Tissue Engineering and Wound Repair. *Cells Tissues Organs*. 2011, 194,6, 469-480.
- Dvorankova B., Szabo P., Lacina L., Kodet O., Matouskova E. & Smetana K. Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. *Histochem. Cell Biol.* 2012, 137,5, 679-685.
- Egeblad M., Nakasone E. S. & Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*. 2010a, 18,6, 884-901.
- Eggermont A. M., Suci S., Testori A., Santinami M., Kruit W. H., Marsden J. et al. Long-term results of the randomized phase III trial EORTC 18991 of adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation in resected stage III melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2012, 30,31, 3810-8.
- Fernandez Figueras M. T. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma: pathophysiology revisited. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2017, 31 Suppl 2, 5-7.
- Fitzmaurice C., Dicker D., Pain A., Hamavid H., Moradi-Lakeh M., MacIntyre M. F. et al. et al. The Global Burden of Cancer 2013 Global Burden of Disease Cancer Collaboration. *JAMA Oncol.* 2015, 1,4, 505-527.
- Flach E. H., Rebecca V. W., Herlyn M., Smalley K. S. M. & Anderson A. R. A. Fibroblasts Contribute to Melanoma Tumor Growth and Drug Resistance. *Mol. Pharm.* 2011, 8,6, 2039-2049.
- Forsea A. M., Del Marmol V., De Vries E., Bailey E. E. & Geller A. C. Melanoma incidence and mortality in Europe: new estimates, persistent disparities. *Br. J. Dermatol.* 2012a, 167,5, 1124-30.
- Fukino K., Shen L., Patocs A., Mutter G. L. & Eng C. Genomic instability within tumor stroma and clinicopathological characteristics of sporadic primary invasive breast carcinoma. *JAMA*. 2007, 297,19, 2103-2111.
- Gabellini C., Gomez-Abenza E., Ibanez-Molero S., Tupone M. G., Perez-Oliva A. B., De Oliveira S., Del Bufalo D. & Mulero V. Interleukin 8 mediates bcl-xL-induced enhancement of human melanoma cell dissemination and angiogenesis in a zebrafish xenograft model. *Int. J. Cancer*. 2018, 142,3, 584-596.
- Gal P., Vasilenko T., Kostelnikova M., Jakubco J., Kovac I., Sabol F. et al. Open Wound Healing In Vivo: Monitoring Binding and Presence of Adhesion/Growth-Regulatory Galectins in Rat Skin during the Course of Complete Re-Epithelialization. *Acta Histochem. Cytochem.* 2011, 44,5, 191-199.
- Garbe C., Buttner P., Bertz J., Burg G., D'hoedt B., Drepper H. et al. Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer*. 1995, 75,10, 2484-91.
- Garbe C., Eigentler T. K., Keilholz U., Hauschild A. & Kirkwood J. M. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist*. 2011, 16,1, 5-24.
- Gershenwald J. E., Scolyer R. A., Hess K. R., Sondak V. K., Long G. V., Ross M. I. et al. The International Melanoma D. & Discovery P. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer. J. Clin.* 2017, 67,6, 472-492.

- Golan T., Messer A. R., Amitai-Lange A., Melamed Z., Ohana R., Bell R. E. et al. Interactions of Melanoma Cells with Distal Keratinocytes Trigger Metastasis via Notch Signaling Inhibition of MITF. *Mol. Cell.* 2015, 59,4, 664-676.
- Graham J. H. & Helwig E. B. Erythroplasia of Queyrat. A clinicopathologic and histochemical study. *Cancer.* 1973, 32,6, 1396-414.
- Gray A., Grushchak S., Mudaliar K., Kliethermes S., Carey K. & Hutchens K. A. The microenvironment in primary cutaneous melanoma with associated spontaneous tumor regression: evaluation for T-regulatory cells and the presence of an immunosuppressive microenvironment. *Melanoma Res.* 2017, 27,2, 104-109.
- Guarino M., Tosoni A. & Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum. Pathol.* 2009, 40,10, 1365-76.
- Guida M., Riccobon A., Biasco G., Ravaioli A., Casamassima A., Freschi A. et al. I. Basal level and behaviour of cytokines in a randomized outpatient trial comparing chemotherapy and biochemotherapy in metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 2006, 16,4, 317-23.
- Haass N. K., Ripperger D., Wladykowski E., Dawson P., Gimotty P. A., Blome C. et al. Melanoma progression exhibits a significant impact on connexin expression patterns in the epidermal tumor microenvironment. *Histochem. Cell Biol.* 2010a, 133,1, 113-124.
- Han D., Zager J. S., Shyr Y., Chen H., Berry L. D., Iyengar S. et al. Clinicopathologic predictors of sentinel lymph node metastasis in thin melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2013, 31,35, 4387-93.
- Han J., Colditz G. A. & Hunter D. J. Risk factors for skin cancers: a nested case-control study within the Nurses' Health Study. *Int. J. Epidemiol.* 2006, 35,6, 1514-21.
- Hanahan D. & Weinberg R. A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000, 100,1, 57-70.
- Haviv I., Polyak K., Qiu W., Hu M. & Campbell I. Origin of carcinoma associated fibroblasts. *Cell Cycle.* 2009, 8,4, 589-595.
- Hill R., Song Y. R., Cardiff R. D. & Van Dyke T. Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis. *Cell.* 2005, 123,6, 1001-1011.
- Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J. Invest. Dermatol.* 2007, 127,3, 526-537.
- Ishida Y., Agata Y., Shibahara K. & Honjo T. Induced Expression of Pd-1, a Novel Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell-Death. *EMBO J.* 1992, 11,11, 3887-3895.
- Ivanov V. N. & Hei T. K. Regulation of viability, differentiation and death of human melanoma cells carrying neural stem cell biomarkers: a possibility for neural trans-differentiation. *Apoptosis.* 2015, 20,7, 996-1015.
- Jaimes N., Braun R. P., Thomas L. & Marghoob A. A. Clinical and dermoscopic characteristics of amelanotic melanomas that are not of the nodular subtype. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2012, 26,5, 591-6.
- Jayatilaka H., Tyle P., Chen J. J., Kwak M., Ju J., Kim H. J., Lee J. S. H., Wu P. H., Gilkes D. M., Fan R. & Wirtz D. Synergistic IL-6 and IL-8 paracrine signalling pathway infers a strategy to inhibit tumour cell migration. *Nat. Commun.* 2017, 8, 15584.
- Jayson G. C., Kerbel R., Ellis L. M. & Harris A. L. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet.* 2016, 388,10043, 518-29.

- Jiang H., Gebhardt C., Umansky L., Beckhove P., Schulze T. J., Utikal J. & Umansky V. Elevated chronic inflammatory factors and myeloid-derived suppressor cells indicate poor prognosis in advanced melanoma patients. *Int. J. Cancer*. 2015, 136,10, 2352-60.
- Jobe N. P., Rosel D., Dvorankova B., Kodet O., Lacina L., Mateu R., Smetana K. & Brabek J. Simultaneous blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness. *Histochem. Cell Biol.* 2016, 146,2, 205-17.
- Jobe N. P., Zivicova V., Mifkova A., Rosel D., Dvorankova B., Kodet O. et al. Fibroblasts potentiate melanoma cells in vitro invasiveness induced by UV-irradiated keratinocytes. *Histochem. Cell Biol.* 2018, 149,5, 503-516.
- Jotzu C., Alt E., Welte G., Li J., Hennessy B. T., Devarajan E. et al. Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. *Cell Oncol. (Dordr)*. 2011, 34,1, 55-67.
- Kabashima-Niibe A., Higuchi H., Takaishi H., Masugi Y., Matsuzaki Y., Mabuchi Y. et al. Mesenchymal stem cells regulate epithelial-mesenchymal transition and tumor progression of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci*. 2013, 104,2, 157-64.
- Kalal B. S., Upadhy D. & Pai V. R. Chemotherapy resistance mechanisms in advanced skin cancer. *Oncol. Rev.* 2017, 11,1, 19-25.
- Kaltner H. & Gabius H. J. A toolbox of lectins for translating the sugar code: the galectin network in phylogenesis and tumors. *Histol. Histopathol.* 2012, 27,4, 397-416.
- Karagiannis P., Fittall M. & Karagiannis S. N. Evaluating biomarkers in melanoma. *Front. Oncol.* 2014, 4, 383.
- Kareva I. What Can Ecology Teach Us About Cancer? *Transl. Oncol.* 2011, 4,5, 266-270.
- Kavalukas S. L., Uzgar A. R., Bivalacqua T. J. & Barbul A. Arginase inhibition promotes wound healing in mice. *Surgery*. 2012, 151,2, 287-95.
- Keir M. E., Butte M. J., Freeman G. J. & Sharpe A. H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev. Immunol.* 2008, 26, 677-704.
- Keswell D., Davids L. M. & Kidson S. H. Migration of human melanocytes into keratinocyte monolayers in vitro. *J. Dermatol. Sci.* 2012, 66,2, 160-3.
- Kideryova L., Lacina L., Dvorankova B., Stork J., Cada Z., Szabo P. et al. Phenotypic characterization of human keratinocytes in coculture reveals differential effects of fibroblasts from benign fibrous histiocytoma (dermatofibroma) as compared to cells from its malignant form and to normal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 2009, 55,1, 18-26.
- Klima J., Lacina L., Dvorankova B., Herrmann D., Carnwath J. W., Niemann H. et al. Differential regulation of galectin expression/reactivity during wound healing in porcine skin and in cultures of epidermal cells with functional impact on migration. *Physiol. Res.* 2009, 58,6, 873-84.
- Kodet O., Dvorankova B., Krejci E., Szabo P., Dvorak P., Stork J. et al. Cultivation-dependent plasticity of melanoma phenotype. *Tumour Biol.* 2013a, 34,6, 3345-3355.
- Kodet O., Lacina L., Krejci E., Dvorankova B., Grim M., Stork J. et al. Melanoma cells influence the differentiation pattern of human epidermal keratinocytes. *Mol. Cancer*. 2015, 14, 1.
- Kolar M., Szabo P., Dvorankova B., Lacina L., Gabius H. J., Strnad H. et al. Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial

- cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biol Cell*. 2012, 104,12, 738-51.
- Kopantzev E. P., Vayshlya N. A., Kopantseva M. R., Egorov V. I., Pikunov M., Zinovyeva M. et al. Cellular and molecular phenotypes of proliferating stromal cells from human carcinomas. *Br. J. Cancer*. 2010, 102,10, 1533-1540.
- Krasagakis K., Garbe C., Schrier P. I. & Orfanos C. E. PARACRINE AND AUTOCRINE REGULATION OF HUMAN MELANOCYTE AND MELANOMA CELL-GROWTH BY TRANSFORMING GROWTH-FACTOR-BETA IN-VITRO. *Anticancer Res.*. 1994, 14,6B, 2565-2571.
- Krasagakis K., Tholke D., Farthmann B., Eberle J., Mansmann U. & Orfanos C. E. Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta 1 and TGF-beta 2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br. J. Cancer*. 1998, 77,9, 1492-1494.
- Kulesa P. M., Kasemeier-Kulesa J. C., Teddy J. M., Margaryan N. V., Seftor E. A. et al. Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *PNAS* 2006a, 103,10, 3752-3757.
- Kundu J. K. & Surh Y. J. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat. Res*. 2008, 659,1-2, 15-30.
- Kurose K., Hoshaw-Woodard S., Adeyinka A., Lemeshow S., Watson P. H. & Eng C. Genetic model of multi-step breast carcinogenesis involving the epithelium and stroma: clues to tumour-microenvironment interactions. *Hum. Mol. Genet*. 2001, 10,18, 1907-13.
- Lacina L., Coma M., Dvorankova B., Kodet O., Melegova N., Gal P. & Smetana K., Jr. Evolution of Cancer Progression in the Context of Darwinism. *Anticancer Res*. 2019, 39,1, 1-16.
- Lacina L., Dvořánková B., Smetana K., Chovanec M., Plzák J., Tachezy R. et al. Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture. *Int. J. Rad. Biol.*. 2007, 83,11-12, 837-848.
- Lacina L., Kodet O., Dvorankova B., Szabo P. & Smetana K., Jr. Ecology of melanoma cell. *Histol. Histopathol*. 2018, 33,3, 247-254.
- Lacina L., Smetana K., Dvorankova B., Pytlik R., Kideryova L., Kucerova L. et al. Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *Br. J. Dermatol*. 2007b, 156,5, 819-829.
- Lansbury L., Bath-Hextall F., Perkins W., Stanton W. & Leonardi-Bee J. Interventions for non-metastatic squamous cell carcinoma of the skin: systematic review and pooled analysis of observational studies. *BMJ*. 2013, 347, f6153.
- Lasithiotakis K. G., Leiter U., Gorkiewicz R., Eigentler T., Breuninger H., Metzler G., Strobel W. & Garbe C. The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003. *Cancer*. 2006, 107,6, 1331-9.
- Lavi G., Voronov E., Dinarello C. A., Apte R. N. & Cohen S. Sustained delivery of IL-1 Ra from biodegradable microspheres reduces the number of murine B16 melanoma lung metastases. *J. Control Release*. 2007, 123,2, 123-30.
- Lavker R. M., Sun T. T., Oshima H., Barrandon Y., Akiyama M., Ferraris C. et al. Hair follicle stem cells. *J. Invest. Dermatol. Symp. Pro.*. 2003, 8,1, 28-38.

- Leach D. R., Krummel M. F. & Allison J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996, 271,5256, 1734-6.
- Lebleu V. S., Taduri G., O'connell J., Teng Y. Q., Cooke V. G., Woda C., Sugimoto H. & Kalluri R. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nature Med*. 2013, 19,8, 1047-1054.
- Lee L. M. J., Seftor E. A., Bonde G., Cornell R. A. & Hendrix M. J. C. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: Assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev. Dynam.*. 2005, 233,4, 1560-1570.
- Li L., Dragulev B., Zigrino P., Mauch C. & Fox J. W. The invasive potential of human melanoma cell lines correlates with their ability to alter fibroblast gene expression in vitro and the stromal microenvironment in vivo. *Int. J. Cancer*. 2009, 125,8, 1796-1804.
- Li L. H. & Clevers H. Coexistence of Quiescent and Active Adult Stem Cells in Mammals. *Science*. 2010, 327,5965, 542-545.
- Lichtenberger B. M., Tan P. K., Niederleithner H., Ferrara N., Petzelbauer P. & Sibilio M. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell*. 2010, 140,2, 268-79.
- Llopiz D., Dotor J., Casares N., Bezunartea J., Diaz-Valdes N., Ruiz M. et al. Peptide inhibitors of transforming growth factor-beta enhance the efficacy of antitumor immunotherapy. *Int. J. Cancer*. 2009, 125,11, 2614-2623.
- Lopez-Novoa J. M. & Nieto M. A. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol. Med*. 2009, 1,6-7, 303-14.
- Lu C. & Kerbel R. S. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J. Cell Biol*. 1993, 120,5, 1281-8.
- Luke J. J., Flaherty K. T., Ribas A. & Long G. V. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2017, 14,8, 463-482.
- Ma H. L., Whitters M. J., Jacobson B. A., Donaldson D. D., Collins M. & Dunussi-Joannopoulos K. Tumor cells secreting IL-13 but not IL-13Ralpha2 fusion protein have reduced tumorigenicity in vivo. *Int. Immunol*. 2004, 16,7, 1009-17.
- Marcil I. & Stern R. S. Risk of developing a subsequent nonmelanoma skin cancer in patients with a history of nonmelanoma skin cancer: a critical review of the literature and meta-analysis. *Arch. Dermatol*. 2000, 136,12, 1524-30.
- Markopoulos A., Albanidou-Farmaki E. & Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis*. 2004, 10,4, 212-6.
- Martens M. C., Seebode C., Lehmann J. & Emmert S. Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies: An Update. *Anticancer Res*. 2018, 38,2, 1153-1158.
- Mccracken M. N., George B. M., Kao K. S., Marjon K. D., Raveh T. & Weissman I. L. Normal and Neoplastic Stem Cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*. 2016, 81, 1-9.
- Mcdonald L. T. & Larue A. C. Hematopoietic stem cell derived carcinoma-associated fibroblasts: a novel origin. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 2012, 5,9, 863-73.

- Mgrditchian T., Arakelian T., Paggetti J., Noman M. Z., Viry E., Moussay E. et al. Targeting autophagy inhibits melanoma growth by enhancing NK cells infiltration in a CCL5-dependent manner. *PNAS* 2017, 114,44, E9271-E9279.
- Miller A., Mcleod L., Alhayyani S., Szczepny A., Watkins D. N., Chen W. et al. Blockade of the IL-6 trans-signalling/STAT3 axis suppresses cachexia in Kras-induced lung adenocarcinoma. *Oncogene*. 2017, 36,21, 3059-3066.
- Mizui M. Natural and modified IL-2 for the treatment of cancer and autoimmune diseases. *Clin. Immunol.* 2018.
- Mocellin S., Zavagno G. & Nitti D. The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Int. J. Cancer*. 2008, 123,10, 2370-6.
- Moretti S., Chiarugi A., Semplici F., Salvi A., De Giorgi V., Fabbri P. & Mazzoli S. Serum imbalance of cytokines in melanoma patients. *Melanoma Res.* 2001, 11,4, 395-9.
- Morris J. C., Tan A. R., Olencki T. E., Shapiro G. I., Dezube B. J., Reiss M. et al. Phase I Study of GC1008 (Fresolimumab): A Human Anti-Transforming Growth Factor-Beta (TGF beta) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Malignant Melanoma or Renal Cell Carcinoma. *Plos One*. 2014, 9,3.
- Motaparthi K., Kapil J. P. & Velazquez E. F. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Review of the Eighth Edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Guidelines, Prognostic Factors, and Histopathologic Variants. *Adv. Anat. Pathol.* 2017, 24,4, 171-194.
- Mouawad R., Benhammouda A., Rixe O., Antoine E. C., Borel C., Weil M., Khayat D. & Soubrane C. Endogenous interleukin 6 levels in patients with metastatic malignant melanoma: Correlation with tumor burden. *Clin. Cancer Res.* 1996, 2,8, 1405-1409.
- Mueller L., Goumas F. A., Affeldt M., Sandtner S., Gehling U. M., Brilloff S. et al. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am. J. Pathol.* 2007, 171,5, 1608-18.
- Muhlrad A., Grintsevich E. E. & Reisler E. Polycation induced actin bundles. *Biophys. Chem.* 2011, 155,1, 45-51.
- Narsale A. A. & Carson J. A. Role of interleukin-6 in cachexia: therapeutic implications. *Curr. Opin. Support Palliat. Care*. 2014, 8,4, 321-7.
- Nedeva I., Koripelly G., Caballero D., Chieze L., Guichard B., Romain B. et al. Synthetic polyamines promote rapid lamellipodial growth by regulating actin dynamics. *Nature Commun.* 2013, 4.
- Nevala W. K., Vachon C. M., Leontovich A. A., Scott C. G., Thompson M. A., Markovic S. N. & Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer C. Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15,6, 1931-9.
- Ohm J. E., Gabrilovich D. I., Sempowski G. D., Kisseleva E., Parman K. S., Nadaf S. & Carbone D. P. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood*. 2003, 101,12, 4878-86.
- Oriolaudit C., Hosseini M. W. & Lehn J. M. SUPERPOLYAMINES - MACROCYCLIC POLYAMINES INDUCE HIGHLY EFFICIENT ACTIN POLYMERIZATION. *Eur. J. Biochem.* 1985, 151,3, 557-559.



- Orth J. D., Loewer A., Lahav G. & Mitchison T. J. Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in DNA damage and p53 induction. *Mol. Biol. Cell.* 2012, 23,4, 567-76.
- Ortiz A. & Fuchs S. Y. Anti-metastatic functions of type 1 interferons: Foundation for the adjuvant therapy of cancer. *Cytokine.* 2017, 89, 4-11.
- Ouyang Z. X., Wu H. W., Li L. Q., Luo Y., Li X. N. & Huang G. Regulatory T cells in the immunotherapy of melanoma. *Tumor Biol.* 2016, 37,1, 77-85.
- Pampena R., Kyrgidis A., Lallas A., Moscarella E., Argenziano G. & Longo C. A meta-analysis of nevus-associated melanoma: Prevalence and practical implications. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2017.
- Petersen O. W., Nielsen H. L., Gudjonsson T., Villadsen R., Rank F., Niebuhr E. et al. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *Am. J. Pathol.* 2003, 162,2, 391-402.
- Pettersen K., Andersen S., Degen S., Tadini V., Grosjean J., Hatakeyama S. et al. Cancer cachexia associates with a systemic autophagy-inducing activity mimicked by cancer cell-derived IL-6 trans-signaling. *Sci. Rep.* 2017, 7,1, 2046.
- Plzak J., Lacina L., Chovanec M., Dvorankova B., Szabo P., Cada Z. & Smetana K. Epithelial-Stromal Interaction in Squamous Cell Epithelium-derived Tumors: An Important New Player in the Control of Tumor Biological Properties. *Anticancer Res.* 2010a, 30,2, 455-462.
- Polyak K., Haviv I. & Campbell I. G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment. *Trends Genet.* 2009, 25,1, 30-8.
- Quante M., Tu S. P., Tomita H., Gonda T., Wang S. S., Takashi S. et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell.* 2011, 19,2, 257-72.
- Redmer T., Welte Y., Behrens D., Fichtner I., Przybilla D., Wruck W. et al. The Nerve Growth Factor Receptor CD271 Is Crucial to Maintain Tumorigenicity and Stem-Like Properties of Melanoma Cells. *Plos One.* 2014, 9,5.
- Rowe D. E., Carroll R. J. & Day C. L., Jr. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1992, 26,6, 976-90.
- Sanmamed M. F., Carranza-Rua O., Alfaro C., Onate C., Martin-Algarra S., Perez G. et al. Serum interleukin-8 reflects tumor burden and treatment response across malignancies of multiple tissue origins. *Clin. Cancer Res.* 2014, 20,22, 5697-707.
- Sanmamed M. F., Perez-Gracia J. L., Schalper K. A., Fusco J. P., Gonzalez A., Rodriguez-Ruiz M. E. et al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann. Oncol.* 2017, 28,8, 1988-1995.
- Seftor E. A., Seftor R. E. B., Weldon D. S., Kirsammer G. T., Margaryan N. V., Gilgur A. & Hendrix M. J. C. Melanoma Tumor Cell Heterogeneity: A Molecular Approach to Study Subpopulations Expressing the Embryonic Morphogen Nodal. *Sem. Oncol.* 2014, 41,2, 259-266.

- Sekulic A., Migden M. R., Oro A. E., Dirix L., Lewis K. D., Hainsworth J. D. et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2012, 366,23, 2171-9.
- Shikinaka K., Kakugo A., Osada Y. & Gong H. P. Mechanism on Polarity Sorting of Actin Bundles Formed with Polycations. *Langmuir*. 2009, 25,3, 1554-1557.
- Sieber-Blum M., Grim M., Hu Y. F. & Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev. Dynam.* 2004, 231,2, 258-269.
- Singh S., Singh A. P., Sharma B., Owen L. B. & Singh R. K. CXCL8 and its cognate receptors in melanoma progression and metastasis. *Future Oncol.* 2010, 6,1, 111-6.
- Sleeman J. & Steeg P. S. Cancer metastasis as a therapeutic target. *Eur. J. Cancer.* 2010, 46,7, 1177-1180.
- Smetana K., Andre S., Kaltner H., Kopitz J. & Gabius H.-J. Context-dependent multifunctionality of galectin-1: a challenge for defining the lectin as therapeutic target. *Exp. Opin. Ther. Targets.* 2013a, 17,4, 379-392.
- Smetana K., Dvořánková B., Szabo P., Strnad H. & Kolář M. 2013b. Role of stromal fibroblasts in cancer originated from squamous epithelia. *Dermal Fibroblasts: Histological Perspectives, Characterization and Role in Disease*. Nova Science Publishers, Inc.
- Smetana K., Jr., Dvorankova B. & Lacina L. Phylogeny, regeneration, ageing and cancer: role of microenvironment and possibility of its therapeutic manipulation. *Folia Biol. (Praha)*. 2013, 59,6, 207-16.
- Strizzi L., Hardy K. M., Kirsammer G. T., Gerami P. & Hendrix M. J. C. Embryonic signaling in melanoma: potential for diagnosis and therapy. *Lab. Invest.* 2011, 91,6, 819-824.
- Strnad H., Lacina L., Kolar M., Cada Z., Vlcek C., Dvorankova B. et al. Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. *Histochem. Cell Biol.* 2010a, 133,2, 201-211.
- Sugimoto H., Mundel T. M., Kieran M. W. & Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* 2006, 5,12, 1640-6.
- Swetter S. M., Boldrick J. C., Jung S. Y., Egbert B. M. & Harvell J. D. Increasing incidence of lentigo maligna melanoma subtypes: northern California and national trends 1990-2000. *J. Invest. Dermatol.* 2005, 125,4, 685-91.
- Szabo P., Kolar M., Dvorankova B., Lacina L., Stork J., Vlcek C et al. Mouse 3T3 fibroblasts under the influence of fibroblasts isolated from stroma of human basal cell carcinoma acquire properties of multipotent stem cells. *Biol. Cell.* 2011a, 103,5, 233-248.
- Thiery J. P. & Sleeman J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2006, 7,2, 131-142.
- Tirosh I., Izar B., Prakadan S. M., Wadsworth M. H., Treacy D., Trombetta J. J. et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. 2016, 352,6282, 189-196.
- Tomasek J. J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C. & Brown R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, 3,5, 349-363.

- Topczewska J. M., Postovit L. M., Margaryan N. V., Sam A., Hess A. R., Wheaton W. W. et al. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat. Med.* 2006, 12,8, 925-32.
- Torisu-Itakura H., Lee J. H., Scheri R. P., Huynh Y., Ye X., Essner R. & Morton D. L. Molecular characterization of inflammatory genes in sentinel and nonsentinel nodes in melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2007, 13,11, 3125-32.
- Trakatelli M., Morton C., Nagore E., Ulrich C., Del Marmol V., Peris K., Basset-Seguin N. & Forum B. C. C. S. O. T. G. C. O. T. E. D. Update of the European guidelines for basal cell carcinoma management. *Eur. J. Dermatol.* 2014, 24,3, 312-29.
- Uemura M., Trinh V. A., Haymaker C., Jackson N., Kim D. W., Allison J. P. et al. Selective inhibition of autoimmune exacerbation while preserving the anti-tumor clinical benefit using IL-6 blockade in a patient with advanced melanoma and Crohn's disease: a case report. *J. Hematol. Oncol.* 2016, 9,1, 81.
- Vachtenheim J. & Ondrusova L. Microphthalmia-associated transcription factor expression levels in melanoma cells contribute to cell invasion and proliferation. *Exp. Dermatol.* 2015, 24,7, 481-484.
- Van Allen E. M., Wagle N., Sucker A., Treacy D. J., Johannessen C. M., Goetz E. M. et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov.* 2014, 4,1, 94-109.
- Volkmer B. & Greinert R. UV and Children's skin. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 2011, 107,3, 386-388.
- Von Domarus H. & Stevens P. J. Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases and review of 170 cases in the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1984, 10,6, 1043-60.
- Vranova J., Arenbergerova M., Arenberger P., Vrana A., Zivcak J., Kolarova H. & Rosina J. Malignant melanoma in the Czech Republic: incidence and mortality according to sex, age and disease stage. *Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2014, 158,3, 438-46.
- Warycha M. A., Christos P. J., Mazumdar M., Darvishian F., Shapiro R. L., Berman R. S. et al. Changes in the presentation of nodular and superficial spreading melanomas over 35 years. *Cancer.* 2008, 113,12, 3341-8.
- Watts T. L. & Cui R. W. Malignant melanoma induces migration and invasion of adult mesenchymal stem cells. *Laryngoscope.* 2012, 122,12, 2769-2772.
- Weber J. S., O'day S., Urba W., Powderly J., Nichol G., Yellin M., Snively J. & Hersh E. Phase I/II study of ipilimumab for patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2008, 26,36, 5950-6.
- Weigelt B. & Bissell M. J. Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2008, 18,5, 311-321.
- Werner R. N., Sammain A., Erdmann R., Hartmann V., Stockfleth E. & Nast A. The natural history of actinic keratosis: a systematic review. *Br. J. Dermatol.* 2013, 169,3, 502-18.
- Whipple C. A. & Brinckerhoff C. E. BRAF(V600E) melanoma cells secrete factors that activate stromal fibroblasts and enhance tumourigenicity. *Br. J. Cancer.* 2014, 111,8, 1625-1633.

- Yin M., Soikkeli J., Jahkola T., Virolainen S., Saksela O. & Holtta E. TGF-beta Signaling, Activated Stromal Fibroblasts, and Cysteine Cathepsins B and L Drive the Invasive Growth of Human Melanoma Cells. *Am. J. Pathol.* 2012, 181,6, 2202-2216.
- Yurkovetsky Z. R., Kirkwood J. M., Edington H. D., Marrangoni A. M., Velikokhatnaya L., Winans M. T., Gorelik E. & Lokshin A. E. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha 2b. *Clin. Cancer Res.* 2007b, 13,8, 2422-2428.
- Zeisberg E. M., Potenta S., Xie L., Zeisberg M. & Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer. Res.* 2007, 67,21, 10123-8.
- Zhang Y. & Ertl H. C. J. Depletion of FAP(+) cells reduces immunosuppressive cells and improves metabolism and functions CD8(+)T cells within tumors. *Oncotarget.* 2016, 7,17, 23282-23299.